

# ANNALES DE L'INSTITUT PASTEUR

(JOURNAL DE MICROBIOLOGIE)

FONDÉES SOUS LE PATRONAGE DE **M. PASTEUR**

ET PUBLIÉES

PAR

**M. E. DUCLAUX**

MEMBRE DE L'INSTITUT

PROFESSEUR A LA SORBONNE

DIRECTEUR DE L'INSTITUT PASTEUR

Assisté d'un Comité de rédaction composé de

- MM. CHAMBERLAND**, chef de service à l'Institut Pasteur;  
**D<sup>r</sup> GRANCHER**, professeur à la Faculté de médecine;  
**METCHNIKOFF**, chef de service à l'Institut Pasteur;  
**NOCARD**, professeur à l'École vétérinaire d'Alfort;  
**D<sup>r</sup> ROUX**, sous-directeur de l'Institut Pasteur;  
**D<sup>r</sup> VAILLARD**, professeur au Val-de-Grâce.

—  
TOME DOUZIÈME

1898

AVEC NEUF PLANCHES  
—

PARIS

**MASSON ET C<sup>ie</sup>, ÉDITEURS**

**LIBRAIRES DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE**

**120, BOULEVARD SAINT-GERMAIN**

QR  
1  
A475  
v.12  
1898  
PER

THE UNIVERSITY OF CHICAGO

LIBRARY

1911

THE UNIVERSITY OF CHICAGO  
LIBRARY  
1911

1911

1911

1911

THE UNIVERSITY OF CHICAGO  
LIBRARY  
1911

---

# ANNALES

DE

# L'INSTITUT PASTEUR

---

## LES MICROBES DES NODOSITÉS DES LÉGUMINEUSES

PAR M. MAZÉ

Préparateur à l'Institut Pasteur

---

SECOND MÉMOIRE  
Étude physiologique.

---

Dans un travail antérieur <sup>1</sup>, j'ai montré que les bacilles des légumineuses, placés dans un milieu convenable qui rappelle d'aussi près que possible les conditions naturelles qu'ils trouvent dans les nodosités, se développent d'une façon surprenante, et remplissent leur fonction si importante de la fixation de l'azote libre de l'atmosphère. La symbiose n'est plus nécessaire pour expliquer la fixation de l'azote par le microbe des nodosités ; cette propriété lui appartient en propre. Les conditions qui la lui assurent sont la présence d'une réserve d'azote combinée assurant les premières phases de son existence ; une dose de sucre qui ne peut tomber au-dessous de 2 0/0 ; enfin l'accès facile de l'air. A cette question de la présence de l'air viennent se rattacher beaucoup d'autres questions que le moment est venu d'étudier, et dont l'ensemble constitue un commencement de l'étude physiologique du microbe des nodosités. Nous aborderons, dans un troisième mémoire, son étude morphologique.

## II

### LES MICROBES DES NODOSITÉS ET L'AIR ATMOSPHÉRIQUE

Nous venons de dire que le bacille des légumineuses est un microbe essentiellement aérobie. Pour nous faire une idée nette de ses besoins d'oxygène, prenons deux ballons plats à deux tubu-

1. Ces *Annales*, t. XI, p. 44, 1897.



lures munis d'une couche de quelques millimètres de gélose de même composition que celle qui nous a déjà servi. Ensemençons-les et plaçons-les en dérivation sur le courant d'air dépouillé d'azote combiné qui circule sur d'autres cultures, après les avoir fait précéder d'un tube en U rempli de ponce imbibée de potasse, pour absorber l'acide carbonique de cet air. Isolons maintenant l'atmosphère des deux vases à l'aide de deux pinces à vis placées sur les caoutchoucs des deux extrémités. La masse d'air ainsi confinée est munie d'un manomètre à mercure formé d'un tube en U presque capillaire, gradué.

L'appareil reste fermé pendant huit jours, à une température moyenne de 23-24°. Au bout de ce temps on fait une prise d'air à l'aide d'une trompe de Schlöesing; on la mesure dans une éprouvette de Schlöesing, et on étudie sa composition.

Ces manipulations terminées, on a renouvelé l'atmosphère des cultures à l'aide de la trompe que l'on faisait fonctionner assez longtemps pour entraîner l'acide carbonique dissous. Puis on l'a isolée de nouveau et, 64 heures après, on a recommencé la même opération afin de se rendre compte de l'absorption d'oxygène dans une culture en plein développement.

Une troisième analyse a été faite 24 heures après la seconde.

Voici les résultats en volume rapportés à 100 du gaz, à la pression 760 et à 0°.

NATURE DES GAZ	1 <sup>re</sup> ANALYSE	2 <sup>e</sup> ANALYSE	3 <sup>e</sup> ANALYSE
Acide carbonique.....	20,7	18,7	8,04
Oxygène.....	1,8	3,16	13,41
Azote + argon.....	77,5	78,14	78,55
Acide carbonique + oxygène..	22,5	21,86	21,45

Les chiffres de ce tableau montrent combien le bacille des légumineuses est avide d'oxygène. En 24 heures, une culture d'une surface totale d'environ 27 décim. carrés absorbe le tiers du volume d'oxygène contenu dans une atmosphère confinée de 5 l., soit 330 c. c.

Considérons maintenant les chiffres de la quatrième ligne horizontale; ils sont tous supérieurs au nombre 21 qui représente la teneur normale de l'air en oxygène; cela veut dire que le rapport de l'acide carbonique à l'oxygène est toujours supé-

rieur à 1<sup>1</sup>. A côté d'une combustion complète qui se traduirait par la mise en liberté d'un volume d'acide carbonique égal au volume d'oxygène absorbé, il y a une dislocation plus ou moins avancée de la molécule de saccharose. Les produits intermédiaires de cette dislocation ne sont pas constitués par des acides volatils ou fixes, puisque le milieu conserve sa réaction alcaline ; ils ne peuvent être que des corps plus ou moins oxydés, quelques-uns volatils, dont la présence se révèle par l'odeur caractéristique des cultures. Les milieux liquides qui se chargent peu à peu de tous ces produits de la combustion du sucre, deviennent de plus en plus impropres à la culture du microbe, si on ne prend pas la précaution de les en débarrasser. Voilà une autre raison qui explique la supériorité des cultures peu profondes et de grande surface, au point de vue de la fixation de l'azote atmosphérique.

Ce n'est pas tout, nos chiffres comportent encore un enseignement : on conçoit que les hydrates de carbone soient épuisés rapidement par un dégagement aussi abondant d'acide carbonique. Évaluons, en effet, la quantité de carbone mise en liberté au moment de notre dernière prise d'air, c'est-à-dire après 12 jours d'expérience. Cela est très facile, connaissant le volume de l'atmosphère confinée et la quantité de saccharose introduite dans la culture.

On trouve ainsi que sur 1347<sup>mgr</sup>,3 de carbone introduits dans la culture sous forme de saccharose, 1055<sup>mgr</sup>,6 sont mis en liberté à l'état d'acide carbonique.

Ces chiffres nous prouvent qu'une culture du bacille des nodosités, âgée de 16 à 20 jours, dans laquelle la liqueur de Fehling ne révèle plus trace de sucre réducteur après inversion préalable, a perdu la presque totalité du carbone que le saccharose y avait

1. Ce rapport n'est pas, en réalité, aussi éloigné de l'unité que l'indiquent les calculs ; on ne tient pas compte en effet de l'azote fixé ; on sait cependant que toute diminution d'azote libre se traduit par une augmentation apparente de  $\text{CO}_2 + \text{O}$  ; mais la différence entre les nombres 79 et 77,5 fournis par la première analyse, ne provient pas tout entière de l'appauvrissement de l'atmosphère en azote, car s'il en était ainsi, au bout de huit jours, dans une atmosphère confinée de 5 l., nous obtiendrions un gain d'azote de 70 milligr. Or, en 16 jours, dans un courant d'air continu, nous n'avons pas obtenu ce résultat, à beaucoup près. L'excès d'acide carbonique dégagé sur l'oxygène absorbé se traduit d'ailleurs par une augmentation constante de pression, indépendante des oscillations barométriques.



apporté. Mais, en échange, il s'y est produit un gain d'azote, et il s'y est formé une mucosité si abondante que les milieux liquides servant à la culture, en couche mince, sont presque solidifiés.

Dans la fermentation visqueuse des jus sucrés, quelque chose de semblable se produit; mais l'analogie est toute superficielle. La matière visqueuse provient d'une sorte de transformation isomérique du sucre; avec le bacille des nodosités on assiste à une combustion presque parfaite du saccharose; la mucosité qu'il fabrique nous apparaît donc comme une substance digne d'attention; lorsqu'elle se forme abondamment, il y a fixation d'azote; lorsqu'elle est absente ou peu abondante, on ne constate pas de gain d'azote dans les cultures. C'est ce rapprochement que je voulais mettre en relief: les faits nous l'imposeront encore plus d'une fois dans le cours de ce travail.

D'après tout ce qui précède, nous voyons que le bacille des légumineuses est un microbe essentiellement aérobie; l'azote atmosphérique ne joue dans sa vie qu'un rôle très effacé; une fraction très petite seulement est mise en jeu.

M. Laurent a cependant constaté la formation de colonies dans une atmosphère d'azote pur; cette observation semble en contradiction avec les faits que nous venons d'exposer, et elle mérite d'être étudiée.

Prenons pour cela des tubes à essai ordinaires, et soudons une tubulure à étranglement à l'extrémité fermée; étirons l'autre extrémité de façon à obtenir une tubulure semblable à la première; celle-ci est légèrement inclinée sur l'axe du tube pour permettre de le pencher lorsqu'il contient quelques centimètres cubes de gélose. Grâce à ce dispositif, on peut placer ces tubes les uns à la suite des autres sur un courant d'azote préparé en faisant agir le nitrite de potassium sur le chlorure d'ammonium en solution concentrée; le gaz est débarrassé des produits nitreux et de l'ammoniaque par des flacons laveurs remplis de potasse et d'acide sulfurique. Les tubes sont adaptés encore bouillants sur l'appareil purgé d'air par le dégagement de l'azote.

Puis on attend une demi-heure; au bout de ce temps, la gélose est solide et froide; on l'ensemence avec deux ou trois gouttes d'une dilution copieuse de bacilles, et quelques minutes après, on ferme les deux extrémités à la lampe sur le courant

d'azote. On ensemence ensuite les autres tubes les uns après les autres, et on les scelle à la flamme de la même manière.

Ces cultures ont été conservées à la température de la chambre avec des témoins préparés de la même façon, mais remplis d'air. Au bout de 5 jours ceux-ci donnent une culture abondante; les autres ne présentent pas de développement visible à l'œil nu; on en sacrifie un et on prend avec une pipette une goutte de la dilution qui surnage pour l'ensemencer dans un tube ouvert; celui-ci se couvre de colonies au bout de 3 jours.

Au bout de 15 jours on ouvre deux autres tubes sur lesquels on ne constate pas non plus trace de développement; on s'en sert pour ensemencer des tubes ordinaires; les germes conservés à l'abri de l'air pendant 15 jours poussent encore énergiquement.

On a refait la même expérience avec une nouvelle série de 4 tubes préparés de la même façon; ils ont fourni les mêmes résultats.

Le bacille des légumineuses ne pousse donc pas dans une atmosphère d'azote pur; M. Laurent n'a sans doute observé la formation de colonies que parce que son azote, obtenu par l'oxydation du cuivre porté au rouge, renfermait encore des traces d'oxygène.

### III

#### INFLUENCE DE LA RICHESSE DES MILIEUX EN AZOTE COMBINÉ ET EN SACCHAROSE SUR LA FIXATION DE L'AZOTE LIBRE

Jusqu'ici, nous nous sommes bornés à étudier la fixation de l'azote libre dans des cultures de composition à peu près constante. Deux éléments exercent une action prépondérante sur le résultat final: l'azote combiné et le saccharose; faisons varier l'un et l'autre, et cherchons quelle est l'influence de ces variations sur le gain d'azote.

Dans ce but, mettons en culture 5 ballons plats renfermant 50 c. c. de bouillon de haricots préparé comme plus haut; comme



l'eau du robinet est suffisamment alcaline par elle-même, on supprime le bicarbonate de soude; on supprime également le chlorure de sodium qui, à la dose de 5 0/00, paralyse le développement du microbe. Ces ballons contenaient avant l'expérience :

	AZOTE	SACCHAROSE
N <sup>o</sup> 1.....	44mg,6	4gr,75
— 2.....	9 8	2
— 3.....	9 8	2 25
— 4.....	9	2 50
— 5.....	9	3

*Observations sur les cultures.* — Le n<sup>o</sup> 1 se trouble fortement dans les 24 heures. Les n<sup>os</sup> 2 et 3 se développent plus lentement; les microbes forment une membrane adhérente au fond du vase, visible dès le 2<sup>e</sup> jour; la mucosité se développe presque aussi rapidement que dans le n<sup>o</sup> 1, dont le bouillon est complètement figé au bout de 8-9 jours.

Il n'en est pas de même pour les n<sup>os</sup> 4 et 5; la membrane de fond ne devient visible qu'au 4<sup>e</sup> jour, elle apparaît comme une toile d'araignée dont les mailles irrégulières sont réunies par une membrane extrêmement fine. Examinée au microscope avec un grossissement de 50, on la voit striée; dans toutes les directions, de tubes uniformément colorés, lorsqu'on se sert de colorants basiques; si on fait agir modérément l'alcool, ces tubes s'éclaircissent, et l'on distingue nettement dans leur intérieur de petits bacilles noyés dans une enveloppe de mucosité. Ces tubes présentent des renflements et des étranglements sur tout leur parcours. Nous aurons encore l'occasion de les observer dans d'autres circonstances.

Cette membrane s'épaissit lentement, et au bout du vingt et unième jour de culture, au moment où l'on met fin à l'expérience, le liquide surnageant est tout à fait dépourvu de viscosité; le microbe présente l'aspect d'un bacille qui prend bien la couleur.

La culture n<sup>o</sup> 1 a été arrêtée au dix-neuvième jour; elle présente tous les caractères des cultures dans lesquelles on constate une fixation abondante d'azote.

Les cultures n<sup>os</sup> 2 et 3 présentent des formes ramifiées et des formes en poires; à part ce caractère, elles ressemblent à la première, comme aspect, elles ont duré respectivement 21 et 22 jours.

Voici les résultats concernant l'azote et le sucre restant, fournis par l'analyse; les n<sup>os</sup> 5 et 6 ne figurent pas dans ce tableau; on y retrouve tout le sucre primitif à un décigramme près, et le gain d'azote y a été nul.



	Azote final.	Azote gagné.	Sucre restant.	Sucre consommé.	Rapport de l'azote gagné au sucre consommé.
n° 1	23mgr,7	12mgr,4	0gr,541	4209mgr	$\frac{121}{12090} = \frac{1}{100}$
n° 2	22 ,6	12 ,8	0 ,805	4196	$\frac{128}{11950} > \frac{1}{100}$
n° 3	24 ,8	15	0 ,870	4379,4	$\frac{150}{13794} > \frac{1}{100}$

Eu égard à la durée des cultures, ces résultats sont à peu près identiques; ils concordent avec ceux qui nous ont été fournis par les premières expériences, le rapport de l'azote gagné au sucre consommé oscille toujours aux environs de 1/100.

Ces chiffres nous montrent en outre que le gain d'azote est indépendant de l'aspect morphologique du microbe; la culture n° 1 ne renferme pas de formes ramifiées, les deux autres contiennent un mélange de bacilles simples et de formes ramifiées, ou en poires. Le développement de celles-ci a été cependant plus lent au début; le retard augmente avec la dose de saccharose; à partir de 4,5 0/0, le bacille se multiplie encore, mais la culture reste pauvre; la mucosité ne se forme pas, et il n'y a pas d'azote fixé. Avec 5 et 6 0/0 de sucre, on observe seulement une légère prolifération de microbe.

Calculons maintenant la relation qui existe entre le sucre initial et l'azote fourni au microbe avant l'expérience.

Nous avons les trois rapports suivants :

$$\begin{array}{l} \text{n° 1} \quad \frac{416}{17\,500} = \frac{66}{10\,000} \\ \text{n° 2} \quad \frac{98}{20\,000} = \frac{49}{10\,000} \\ \text{n° 3} \quad \frac{98}{22\,500} = \frac{43}{10\,000} \end{array}$$

Si nous prenons la moyenne, nous obtenons le rapport 1/200 en chiffres ronds, ce qui veut dire que les cultures qui fournissent le meilleur rendement au point de vue de la fixation de l'azote doivent renfermer, au début, une partie d'azote combiné pour 200 de saccharose; la limite inférieure du sucre étant 2 0/0 et la limite supérieure 4 0/0.

Reprenons maintenant la même expérience en laissant constante la dose de saccharose et en introduisant des doses variables d'azote combiné.

Cet élément est représenté dans les cultures par les chiffres

16<sup>mgr</sup>,6, 13<sup>mgr</sup>,3, 9<sup>mgr</sup>,9, 6<sup>mgr</sup>,6, 3<sup>mgr</sup>,3.

ils sont entre eux comme les nombre 5, 4, 3, 2, 1; chaque culture avait reçu 1<sup>gr</sup>,5 de saccharose; les quatre premières se sont montrées à peu près aussi actives les unes que les autres au point de vue de la fixation de l'azote libre; le n° 4 s'est développé plus lentement que les trois autres; le n° 5 a donné une membrane de fond, mince et résistante, mais pas de mucosité ni d'azote fixé: sa teneur en azote initial est insuffisante. Nous sommes donc conduit à assigner comme limite minimum à l'azote combiné dans les bouillons de culture le chiffre de 7 milligrammes pour 50 c. c. de liquide; la limite maximum étant naturellement fixée à 15<sup>mgr</sup> environ par les rapports que nous avons établis plus haut.

Voilà les chiffres; quelles conclusions pouvons-nous en tirer? Ceux qui représentent la limite maximum de saccharose et le minimum d'azote combiné offrent beaucoup d'intérêt. Dans les deux cas, lorsque ces chiffres sont dépassés ou ne sont pas atteints, il n'y a plus de gain d'azote dans les cultures; le développement se fait mal et la mucosité est toujours absente. Cette substance ne se rencontre jamais non plus dans les cultures où le bouillon atteint plusieurs centimètres d'épaisseur et, dans ces conditions, l'analyse ne révèle aucun enrichissement en azote.

Comme nous avons montré, d'autre part, que la mucosité ne résulte pas d'une modification allotropique du sucre, nous sommes conduit à la regarder comme un composé azoté élaboré par le bacille des légumineuses. Dans la série des transformations auxquelles le saccharose est soumis, il se forme des composés capables de s'unir à l'azote atmosphérique, grâce à l'énergie mise en jeu par la dislocation de la molécule de sucre.

Le même phénomène doit se passer dans les tubercules radicaux; cependant, on ne trouve pas de mucosité dans ces formations. Une goutte d'une émulsion faite avec le contenu d'une nodosité possède la fluidité d'une goutte d'eau, et s'étale avec facilité sur une lame de verre. Au contraire, la moindre parcelle d'une culture sur gélose, prise avec un fil de platine, donne une consistance visqueuse à la goutte d'eau dans laquelle on la délaye, et s'étend difficilement sur le verre.

Faut-il en conclure que le bacille des légumineuses ne produit pas de mucosité lorsqu'il se développe dans le tissu des



racines? Cette supposition ne semble pas probable, lorsqu'on voit un fragment de pulpe de nodosité donner sur gélose sucrée une quantité appréciable de cette substance au bout de 24 heures à la température de 24-25°. Si on ne constate pas sa présence dans les tubercules, c'est sans doute parce qu'elle est entraînée par la sève à mesure qu'elle se produit, et c'est probablement elle qui sert de trait d'union entre le microbe et la plante.

Dès que les nodosités apparaissent sur les racines des légumineuses cultivées dans du sable stérile, celles-ci traduisent l'action bienfaisante de leurs hôtes par une reprise très nette de la végétation, succédant à une période de souffrance due à la privation temporaire d'aliment azoté.

MM. Hellriegel et Wilfarth<sup>1</sup>, qui ont observé les premiers ces phénomènes, en ont donné une description très nette :

« Ainsi les cultures de légumineuses, en présence de solutions nutritives pourvues de nitrates depuis leur sortie de terre jusqu'à leur récolte, c'est-à-dire jusqu'à l'épuisement des nitrates fournis, ont continué à croître sans aucune interruption visible, tandis que la végétation des cultures privées d'azote marcha pour ainsi dire, par bonds successifs, à trois époques différentes, non moins claires que frappantes.

« Dans la première période qui comprend les trois ou quatre premières semaines de leur existence, pendant lesquelles les jeunes plantes sont alimentées évidemment par la réserve nutritive de la semence, la croissance fut active et normale. A cette période en succéda une autre d'interruption complète et d'arrêt dans la production. Les jeunes plantes perdirent leur fraîche couleur verte; on voyait les vieilles feuilles périr par résorption, tandis que celles qui étaient nouvellement formées poussaient visiblement plus petites que les premières et fort misérables.

« Enfin, à ce moment, les pois se comportèrent exactement comme les graminées végétant dans un sol privé d'azote et depuis longtemps affamées. La durée de cette période fut très variable pour chaque plante : chez les unes elle ne fut que de quelques jours, et chez les autres elle persista pendant plusieurs semaines. Puis la troisième période suivit presque sans transition; les plantes reverdirent, et, recommençant à assimiler, eurent une bonne végétation jusqu'à la fin. »

1. *Untersuchungen über die Stickstoffnahrung*, Berlin, 1888.

Ces observations établissent clairement que la reprise de la végétation coïncide avec l'apparition des nodosités sur les racines : mais MM. Hellriegel et Wilfarth ne disposaient d'aucune preuve matérielle qui leur permit de donner une démonstration rigoureuse de ce fait. L'étude des cultures pures du bacille des nodosités ne fit que l'embrouiller davantage ; ce microbe se montrait incapable de fixer de l'azote libre dans les milieux artificiels ; tout au plus se développait-il un peu dans les milieux dépourvus d'azote combiné, mais toujours sans gain d'azote appréciable. C'est sur la plante seule qu'il y avait développement, avec fixation d'azote qui, disait-on, entrait dans les tissus des bacilles pour les constituer ; c'est cet azote des bacilles qu'utilisait la plante, et les nodosités devenaient ainsi de véritables organes de réserve. Telle était l'opinion de MM. Beyerinck, Prazmowski<sup>1</sup>, Frank et Laurent.

Les résultats que nous avons obtenus au point de vue de la fixation de l'azote donnent, de l'observation très exacte de MM. Hellriegel et Wilfarth, une explication aussi simple que satisfaisante. Le bacille fabrique, dans certaines conditions de nutrition hydrocarbonée et azotée, une sève muqueuse et azotée que le végétal utilise.

Les caractères physiques de cette mucosité concordent bien avec le rôle que nous lui attribuons : c'est une substance colloïde, diffusible dans l'eau et susceptible, par conséquent, de servir d'aliment à un organisme vivant ; mais quels sont les caractères de cette solution muqueuse ? C'est ce dont on peut se faire une idée en cherchant comment elle traverse les membranes ou les cloisons poreuses.

Une culture de 50 c. c., renfermant 26 milligrammes d'azote, étendue de deux fois son volume d'eau distillée, a été filtrée à travers une bougie Chamberland, sous une pression de 20 c. de mercure ; la bougie plongeait de 2 c. dans l'eau distillée ; la filtration se faisait de l'intérieur vers l'extérieur. Elle a duré 24 heures. La quantité d'azote passée à travers la bougie est de 2<sup>mgr</sup>6, soit 1/10 de l'azote total.

Une deuxième expérience a été faite avec une culture de 50 c. c. étendue également de deux fois son volume d'eau ; mais

1. *Landwirthsch. Versuchstat.*, XXXVIII. — *Bot. Centralbl.*, XXXIX.



ce liquide a été placé cette fois dans un dialyseur cylindrique en papier parcheminé.

L'appareil a été soumis à l'action d'un courant d'eau ordinaire pendant 48 heures, et pendant 36 heures à l'action de l'eau distillée renouvelée toutes les 8 heures. Au bout de ce temps, 0<sup>me</sup>,6 d'azote sur 13<sup>me</sup>,6 ont passé à travers la membrane. Le contenu du dialyseur a conservé toute sa viscosité et son homogénéité.

On a repris cette expérience avec une culture de 100 c. c. étendue cette fois de 8 fois son volume d'eau distillée.

Dans le même laps de temps et dans les mêmes conditions que tout à l'heure, le liquide a perdu 8<sup>me</sup>,5 d'azote; avant l'expérience il en renfermait 32<sup>me</sup>,04; un quart environ de l'azote total avait donc traversé la membrane. Le liquide avait perdu toute sa viscosité ou à peu près; les microbes formaient un dépôt aggloméré au fond du dialyseur.

Cette dernière expérience prouve que la culture renferme, à côté de l'azote immobilisé dans le corps des microbes, un composé quaternaire capable de diffuser à travers les membranes. Cette matière azotée diffuse d'autant mieux qu'elle est plus étendue; dans les nodosités elle est donc entraînée facilement par la sève, et c'est pour cette raison qu'on ne la rencontre jamais dans ces organes<sup>1</sup>.

Il peut sembler surprenant que dans ces conditions le microbe qui la produit ne l'utilise pas, et que nous ayons pu voir notre culture n° 5 (p. 8), qui renfermait au début de l'expérience 3<sup>me</sup>,3 d'azote combiné, ne donner qu'un faible développement sans aucun gain d'azote après 24 jours de durée. On pourrait croire *a priori* qu'il suffise de fournir une trace d'aliment azoté, pour amorcer la culture et permettre au bacille de s'alimenter en fabriquant son protoplasme aux dépens de l'azote libre, et en consommant les hydrates de carbone qu'on lui a offerts.

1. Le hasard m'a permis cependant de la rencontrer une fois dans des tubercules de pois tardifs, qui étaient encore en pleine végétation au mois de novembre dernier. A la suite d'un abaissement assez brusque de la température, l'assimilation par la plante s'est ralentie, et la production de mucosité a été supérieure à la consommation; elle s'est accumulée dans les tubercules, dont la pulpe très pâteuse, déposée dans une goutte d'eau sur une lame de verre, rend le liquide très visqueux.

Cette observation confirme, d'une manière éclatante, les déductions que j'avais déjà formulées.

L'expérience montre pourtant qu'il n'en est rien. Dans une culture pauvre en azote combiné, le développement est pénible; les microbes se multiplient, mais ils perdent leur activité vis-à-vis de l'azote libre; ils ne consomment pas d'hydrate de carbone ou ils en consomment très peu. Ils n'élaborent pas de mucosité visible, et n'utilisent pas les quantités insaisissables qu'ils pourraient fabriquer, car ils ne poussent pas.

Les corps quaternaires qui constituent la mucosité doivent donc nous apparaître comme des produits d'élaboration microbienne, analogues à l'alcool ou à l'acide lactique, qui sont inattaquables par les cellules qui les ont produits, mais restent nutritifs pour d'autres organismes.

De ce que les bacilles vivent péniblement dans les milieux contenant de faibles quantités d'azote combiné, comme dans notre expérience n° 5 (p. 8), nous pouvons inférer qu'ils ne se développeront pas dans des milieux privés d'azote. Cette conclusion est en contradiction avec les observations de MM. Franck, Prazmowski et Laurent, mais elle est d'accord par contre avec les résultats de M. Beyerinck, qui a vu le développement des cultures s'arrêter sur gélose renfermant du sucre et des sels, dès que la petite quantité d'azote assimilable est épuisée.

Il y a donc lieu de vérifier ces résultats contradictoires. J'ai pris pour cela deux ballons plats lavés à plusieurs reprises avec de l'acide sulfurique concentré, puis avec de l'eau ordinaire et avec de l'eau distillée, quatre ou cinq fois, pour en enlever toute trace de matière azotée.

Chacun de ces ballons a reçu 50 c. c. de la solution suivante, faite avec de l'eau distillée et des corps chimiquement purs.

Eau distillée.....	1,000
Saccharose.....	20
Phosphate de potassium.....	4
Chlorure de sodium.....	4
Sulfate de fer.....	} traces
Sulfate de magnésie.....	
Chlorure de zinc.....	
Saccharate de calcium.....	

Les deux ballons, bouchés avec des tampons d'amiante, ont été stérilisés à 120° etensemencés avec une dilution assez riche



d'une culture âgée sur gélose, faite avec de l'eau distillée stérile. Les cultures étaient parcourues par un courant d'air débarassé de tout composé azoté par la méthode employée plus haut.

Au bout de huit jours les solutions sont limpides comme au début de l'expérience.

Le contenu d'un vase, examiné au microscope après coloration par le bleu de méthylène, ne montre que quelques bacilles irréguliers, plus ou moins recourbés et prenant mal la couleur; examinés en goutte suspendue, ces bacilles se montrent immobiles.

Ensemencée sur gélose, une goutte du liquide de culture donnait un développement luxuriant au bout de 3 ou 4 jours.

Le second ballon a été laissé en expérience; mais on a arrêté la circulation d'air et on a supprimé toute communication avec l'atmosphère ambiante. Après 28 jours la solution est toujours limpide; l'examen microscopique et la culture d'épreuve ont donné les mêmes résultats que la première culture.

La conclusion est nette : la semence avait conservé toute sa vitalité pendant 28 jours; mais on n'a pas observé, même au microscope, la moindre prolifération de cellules.

Il nous reste, pour terminer l'examen des expériences faites plus haut, à étudier la nature du pseudo-mycélium que l'on observe dans les nodosités, tout à fait au début de leur développement. Dans une coupe fraîche de jeunes tubercules, cette formation présente l'aspect de tubes réfringents non cloisonnés, irréguliers; ils décrivent dans les jeunes cellules un trajet sinueux et semblent traverser les cloisons sans solution de continuité<sup>1</sup>.

M. Beyerinck les considère comme les restes des filaments nucléaires désagrégés par l'infection microbienne.

M. Prazmowski en a vu sortir des coccobacilles très fins; il les regarde comme une forme transitoire du bacille des légumineuses qui en dérive par voie endogène. Aux yeux de M. Laurent ils ont la même signification; mais pour lui les microbes ne prennent pas naissance par voie endogène; ils se forment par bourgeonnement comme les formes-levures qui se montrent sur

1. Voir à ce sujet les deux belles planches du Mémoire de M. Laurent (ces *Annales*, t. V).

le mycélium de certaines espèces de champignons microscopiques. M. Prillieux <sup>1</sup> affirme que ce sont des trainées d'une mucosité analogue à celle qui se forme dans les cultures.

En rapprochant les observations de MM. Prazmowski et Prillieux des faits que nous avons établis, on peut expliquer la production de ces tubes d'une façon simple. Lorsque le microbe envahit les tissus des jeunes racines, il progresse surtout par voie de multiplication: il élabore aussitôt cette substance glaireuse dans laquelle il reste englobé, et c'est ainsi que s'édifient les tubes irréguliers qui affectent l'aspect d'un mycélium et conservent leur apparence organisée tant que les vaisseaux ne se sont pas formés dans les jeunes tubercules; mais lorsque la circulation de la sève se fait régulièrement dans ces organes, la mucosité est entraînée, et les coccobacilles, débarrassés de leur enveloppe, s'allongent et se ramifient.

Si l'on fait une préparation avec la pulpe d'un jeune tubercule à peine visible à l'œil nu, on ne trouve en effet que des coccobacilles; cette pulpe ne renferme jamais de fragments mycéliens, parce que la substance qui les constitue se diffuse immédiatement dans le suc cellulaire et dans la goutte d'eau que l'on dépose sur la lame de verre.

Si ces tubes étaient formés par un être vivant, ils résisteraient comme tous les microorganismes à ce mode de préparation. Ils ne résistent pas mieux aux manipulations qu'exigent les tissus pour les coupes en séries; on ne peut les soumettre à d'autres méthodes de coloration que celles que l'on emploie pour le protoplasme vivant. (LAURENT, *l. c.*)

Nous trouvons page 6 une autre preuve de cette interprétation, c'est la formation de tubes analogues dans les cultures qui renferment une dose exagérée de saccharose; la seule différence qu'ils présentent avec le pseudo-mycélium consiste dans une question de volume. Colorés par la fuchsine de Ziehl, ils ont l'aspect de gros tubes opaques qui sillonnent dans toutes les directions la fine membrane qui se forme après eux au fond du vase de culture. Si on décolore convenablement à l'alcool, ces tubes deviennent plus transparents, et l'on peut distinguer nettement les coccobacilles qui les remplissent.

1. *Comptes rendus*, t. CXI, p. 926.

## IV

## LE MICROBE DES NODOSITÉS ET L'AZOTE MINÉRAL

Les nitrates et les sels ammoniacaux constituent des aliments pour les microbes des nodosités, comme l'ont établi MM. Frank, Prazmowski, Beyerinck et Laurent.

Le développement est cependant assez médiocre dans les solutions purement minérales, additionnées de 1 0/00 de sulfate d'ammonium, même placées en couche mince dans des ballons plats; les microbes se déposent en cercle dans les parties déclives, et forment une légère couche pulvérulente, facile à mettre en suspension. La liqueur ne prend jamais une consistance visqueuse; le saccharose se retrouve presque intact au bout de quinze jours.

Si on remplace le sel ammoniacal par de l'azotate de sodium à poids égal, il se forme au bout de quinze jours une membrane de fond, et le liquide prend une légère viscosité.

La supériorité de l'azote nitrique sur l'azote ammoniacal s'observe également dans un bouillon formé d'une décoction de terre additionnée de 3 0/0 de saccharose et de 1 0 00 de sulfate d'ammonium ou de nitrate de sodium.

Dans le milieu nitré, le développement se fait régulièrement; il se forme une membrane assez épaisse; le liquide devient visqueux; le saccharose est consommé, et les cultures accusent un léger gain d'azote au bout de 30 jours.

Dans le bouillon ammoniacal on observe seulement, pendant les 4 premiers jours, un dépôt pulvérulent; puis à partir de cette époque, on voit poindre à la surface de ce dépôt quelques zooglées sphériques, d'une couleur blanche, adhérant très peu au fond du vase et s'étirant par la moindre agitation en longs filaments visqueux; ces flocons augmentent peu à peu de volume et se fondent les uns dans les autres: ils sont constitués par un long bacille vacuolaire qui donne des cultures ordinaires sur gélose. Quelque temps après l'apparition des zooglées, on voit se former une légère membrane; le liquide prend une consistance un peu visqueuse; mais, après 30 jours de culture, le saccharose a très peu diminué et le gain d'azote est nul.



Les 50 c. c. de décoction de terre qui constituaient les milieux de culture renfermaient 0<sup>mgr</sup>79 d'azote total provenant du sol; le bouillon nitré ne donnait plus de coloration à la diphénylamine à la fin de l'expérience : le milieu ammouiacal se colorait très nettement au réactif de Nessler.

L'ammoniaque, même en présence de quelques traces d'azote organique, constitue donc un aliment très médiocre pour les microbes des nodosités; ceux-ci poussent aussi bien dans de l'eau de terre pure additionnée de quelques millièmes de saccharose.

Ils se multiplient également dans de la terre stérilisée et dépourvue de nitrates, mais il semble qu'ils soient incapables d'enrichir la terre en azote. Voici les résultats que j'ai obtenus en cultivant les microbes des nodosités dans 50 grammes de terre sur le fond d'un vase à deux tubulures, constamment traversé par un courant d'air lent. Cette terre avait été préalablement lavée pour la débarrasser des nitrates.

L'analyse de l'azote total a fourni les chiffres suivants pour un gramme de terre bien desséchée à 100°.

Terre avant l'expérience.....	7 <sup>mgr</sup> ,05
Terreensemencée avec le bacille des légumineuses..	6 <sup>mgr</sup> ,5

Cette culture a duré trois mois, le bacille avait conservé au bout de ce temps toutes ses propriétés; il n'a pas donné de gain d'azote; mais on ne peut pas considérer ce résultat comme définitif: l'échantillon de terre qui m'a servi a été pris dans l'enclos de l'Institut Pasteur; c'est plutôt un véritable terreau. Un sol, pour s'enrichir en azote sous l'influence des microbes, doit réaliser d'autres conditions; on les connaît suffisamment maintenant pour qu'il soit nécessaire d'y insister plus longuement.

De tout ce qui précède, on peut conclure que ces microbes peuvent vivre dans le sol; on les trouvera surtout très nombreux dans les sols riches en matières organiques, puisque les nitrates, loin de paralyser leur développement, peuvent au besoin leur servir d'aliments.

Les botanistes et les agronomes sont cependant unanimes à constater que les nodosités sont plus nombreuses et plus grosses sur les racines des légumineuses qui poussent dans les terres pauvres. Ils attribuent ce fait à l'action des nitrates; dans les

sols fertiles où cet engrais suffit à assurer largement l'alimentation azotée de la plante, celle-ci peut se passer du secours des microbes et résiste à leur envahissement.

Les mêmes observations peuvent se faire avec des plantes cultivées dans des solutions nutritives stériles. Il y a même plus : quelques auteurs ont remarqué que les tubercules radicaux exercent une influence contrariante sur le développement des légumineuses en présence des nitrates <sup>1</sup>.

On a interprété ces faits de la façon suivante : les légumineuses renferment un composé capable de se combiner aux nitrates, et d'empêcher ensuite le développement du bacille des nodosités. (LAURENT, *loc. cit.*) Celui-ci assimilerait également les nitrates aux dépens de la plante, et par suite la générerait dans son développement. (NOBBE, *loc. cit.*)

Nous allons essayer à notre tour d'élucider la question ; mais auparavant, nous devons établir encore quelques faits nouveaux.

## V

### ACTION DES RACINES DES LÉGUMINEUSES SUR LES FORMES LIBRES DES MICROBES DES NODOSITÉS

Les microbes des nodosités sont très mobiles ; pour observer leurs mouvements, il suffit d'examiner, en goutte suspendue, une culture sur gélose âgée de 4-5 jours, à la température de 25° environ. On les voit doués d'un mouvement de translation très rapide, qu'ils conservent très longtemps en chambre humide. Au-dessus de 25°, la mobilité est beaucoup moins générale ; on ne l'observe plus à 30°, ni au-dessous de 15°.

Le bacille des légumineuses est donc capable d'obéir promptement à des actions chimiotaxiques.

A l'origine de mes recherches, j'ai fait un grand nombre d'inoculations sur des plantes végétant en solutions stériles, dans le but de vérifier la nature du microbe que j'avais isolé des

1. NOBBE. *Versuchsstationen*, 1896. — SCHRIEBAUX. *Agriculture pratique*, 1897. t. I, n° 23.

tubercules. Je n'ai pas tardé à remarquer que ceux-ci se forment toujours, non pas sur les racines anciennes, mais sur les portions de racines qui se sont développées après l'introduction des bacilles dans les solutions nutritives. Cette particularité attira tout de suite mon attention. Essayons d'en découvrir la cause.

Pour montrer que ce sont les extrémités des racines qui attirent les microbes des nodosités, prenons 5 jeunes plants de pois que l'on a fait germer en milieu stérile. Ils ont deux ou trois feuilles, et leurs racines principales ont en moyenne 15 centimètres de long. Coupons ces racines de façon à supprimer la région des poils absorbants, et introduisons-les sur une longueur d'environ 5-6 centimètres dans une dilution de culture pure du microbe des nodosités, contenue dans une poche de collodion hermétiquement fermée avec un tampon de la même substance, bien lavée dans de l'eau distillée. Le liquide de la dilution est identique à la solution nutritive dans laquelle on fait pousser les plantes.

Les résultats de cette expérience sont les suivants : toutes les fois que la portion de racine principale enfermée dans la poche de collodion donne naissance à des racines latérales, celles-ci sont couvertes de tubercules, la première n'en porte jamais, malgré la section qu'on y a pratiquée. Il semble donc que les parties jeunes des racines et plus particulièrement les régions pilifères attirent seules les microbes, et que l'infection de la plante soit provoquée par une substance quelconque qui diffuse à travers les membranes, à la façon par exemple de la sécrétion acide des poils absorbants.

L'action attractive des régions pilifères peut encore être mise en évidence de la façon suivante. Faisons germer quelques pois à l'abri des microbes et transplantons-les dans la terre, bien arrosée, lorsqu'ils portent trois ou quatre feuilles ; au bout de trois semaines environ, ils ont donné trois ou quatre nouvelles feuilles ; arrachons-les et examinons leurs racines ; celles qui étaient formées avant le repiquage ne portent aucun tubercule ; toutes celles qui se sont développées dans le sol en sont pourvues.

Ceci étant établi, il y a lieu de se demander quelle est la substance qui entre en jeu dans ce phénomène de chimiotaxie.



Les hydrates de carbone s'imposent à l'attention en raison de la place si importante qu'ils tiennent dans l'histoire des microbes des nodosités. De plus, on les rencontre dans la sève de tous les végétaux.

On n'a pas montré jusqu'ici, du moins à ma connaissance, qu'il s'en élimine aux extrémités des racines. Dès qu'ils se répandent dans la terre ou dans les solutions nutritives où l'on fait végéter des plantes, ils deviennent la proie des microbes. Il faut donc les rechercher dans les milieux stériles où l'on fait germer des graines.

Prenons quelques lots de dix semences de vesce de Narbonne bien stérilisées; plaçons-les, dans un vase d'Erlenmeyer, sur une couche de coton recouvrant des fragments de verre immergés dans de l'eau distillée, le tout préalablement stérilisé à 120°.

Sur ce nombre de récipients, quelques-uns sont toujours contaminés par des germes apportés par les graines; on les rejette.

Quand les jeunes plantes ont formé une ou deux feuilles, on change le liquide des ballons et on le remplace par de l'eau distillée stérile. On fait cette opération tous les deux ou trois jours en s'assurant avant chaque prise, par des ensemencements sur gélose, que les cultures ne sont pas contaminées. On soumet au fur et à mesure le liquide recueilli à une ébullition prolongée, afin d'être toujours sûr de le conserver à l'abri des microbes.

Au bout de quinze jours, on a accumulé ainsi un demi-litre d'eau de germination. Cette eau évaporée à 30 ou 40°, bouillie avec une goutte d'acide chlorhydrique, et essayée par la liqueur de Fehling, donne un précipité d'oxydure de cuivre caractéristique de la présence d'hydrates de carbone<sup>1</sup>.

1 Je me suis proposé de déterminer par le même procédé la nature de l'acide mis en liberté par les racines; dans ce but, j'ai évaporé à sec 200 c. c. d'eau de germination; l'extrait a été épuisé par l'éther.

Celui-ci évaporé à son tour laisse au fond de la capsule un enduit liquide presque imperceptible, fortement acide au papier de tournesol; on le redissout dans de l'eau distillée, on fait agir à l'ébullition de l'oxyde de zinc pur préparé au laboratoire, on filtre, et on fait évaporer très lentement dans un verre de montre, à l'abri des poussières. Le récipient se recouvre de fines stries concentriques dans lesquelles on distingue au microscope de petites aiguilles enchevêtrées, caractéristiques du lactate de zinc.

L'extrait épuisé par l'éther, redissous dans deux ou trois centimètres cubes d'eau distillée, n'est plus acide.

Nous avons donc le droit de rechercher si les hydrates de carbone, les plus communs dans le règne végétal, exercent une action chimiotaxique sur le bacille des légumineuses.

Je me suis servi, pour faire ces recherches, d'un tube à

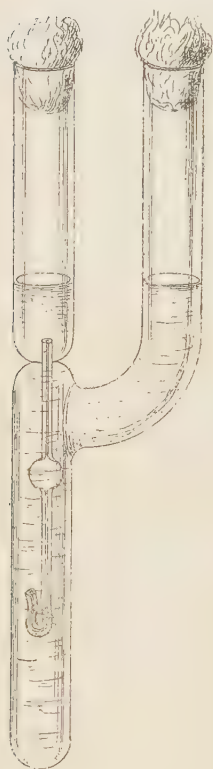


Fig. 1.

essai de 20 centimètres de longueur sur deux de diamètre, divisé en deux compartiments par une cloison en verre; le compartiment supérieur a 8 centimètres de hauteur, l'inférieur en a 12. Celui-ci porte une tubulure latérale, de même diamètre que le tube principal; elle est fixée au-dessous de la cloison. On la ramène, par une courbure convenable, dans la position verticale; son ouverture se trouve dans le même plan que celle du tube. Un tube capillaire très fin, d'une longueur de 8 centimètres, fixé à la cloison au moyen d'une soudure intérieure, met les deux chambres en communication. Son extrémité supérieure affleure de quelques millimètres au-dessus de la cloison. L'autre extrémité porte une courbure dont la petite branche a 5 millimètres de longueur. On souffle une ampoule au tiers inférieur; elle a un diamètre de 8 à 10 millimètres.

Remplissons cet appareil d'un liquide stérile, de façon à faire affleurer la surface libre à une hauteur de 2 centimètres environ au-dessus de la cloison. Plaçons, dans la chambre supérieure, une trace d'un corps soluble convenablement choisi, et laissons tomber dans la chambre inférieure, par la tubulure latérale, deux gouttes d'une dilution de culture jeune sur gélose d'un microbe mobile, faite avec un liquide identique à celui qui remplit l'appareil. Si la substance qui diffuse à travers la colonne liquide du tube capillaire exerce une attraction sur les microbes, ceux-ci pénétreront dans le tube et montent peu à peu dans la chambre supérieure où la concentration du liquide est la plus forte.

On pourra y constater leur présence en faisant, à des inter-

valles de temps plus ou moins espacés, des ensemencements sur gélose avec des prises de liquide.

L'ampoule du tube capillaire et la position latérale de son ouverture inférieure ont pour but d'empêcher le passage accidentel des microbes dans la partie supérieure du grand tube, par un entraînement de liquide occasionné soit par les chocs, soit par une légère dénivellation des deux surfaces libres.

J'ai fait un grand nombre d'essais avec le microbe des nodosités et les hydrates de carbone. Comme milieu, j'ai employé de l'eau physiologique, du bouillon de haricots et de l'eau de terre. C'est ce dernier liquide qui m'a fourni les meilleurs résultats.

J'ai fait agir le saccharose, le glucose, l'amidon soluble, et de l'eau distillée stérile dans laquelle avaient germé des semences de vesce de Narbonne; chacune de ces substances était répartie dans trois tubes à raison de quatre gouttes d'une solution à 2 % dans chaque tube; dans chacun d'eux on introduisait ensuite deux gouttes d'une dilution, dans de l'eau de terre, de culture sur gélose âgée de deux jours. On opérait en même temps sur trois tubes témoins qui ne recevaient que des microbes. Inutile d'ajouter que toutes ces opérations exigent l'emploi de milieux stériles et des cultures pures. Elles ont été faites à une température moyenne de 23-25°.

Deux chiffres permettent d'apprécier l'action exercée par chacune des substances employées : 1° le temps que les microbes mettent à franchir une colonne liquide de 8 centimètres; 2° le nombre des microbes qui franchissent ce trajet dans un temps donné.

Je n'ai employé que le premier procédé, car les hydrates de carbone favorisent la multiplication des microbes, et la question de numération s'en trouve faussée.

En faisant des prises de semence toutes les quatre heures, j'ai constaté de cette façon que les tubes qui ont reçu du saccharose et du glucose donnent tous régulièrement des ensemencements positifs au bout de 8 heures. — Les tubes témoins ne donnent des résultats qu'au bout de 12 heures; ils sont tous fertiles au bout de 16 heures. Les tubes additionnés d'amidon soluble ne présentent qu'une légère avance sur les tubes témoins. Ceux qui ont reçu de l'eau de germination accusent générale-



ment un léger retard sur les témoins ; les prises de liquide ne donnent pas toujours des ensemencements positifs après seize heures.

En résumé, les résultats sont les suivants : les hydrates de carbone attirent les microbes des nodosités ; l'eau de germination semble les repousser.

La raison de cette contradiction n'est pas difficile à découvrir ; l'eau de germination est légèrement acide, et, de plus, elle ne contient que des quantités infinitésimales d'hydrates de carbone. Si l'action des acides n'est pas éliminée par la réaction alcaline des milieux, elle se traduira toujours par un retard très sensible, car les acides, employés à raison de deux ou trois gouttes d'une solution à 1/1000 par tube, suffisent pour conserver la stérilité du liquide des chambres supérieures pendant plus de 24 heures. Quelquefois, les prises de semence redeviennent stériles après avoir donné des résultats positifs. Si l'alcalinité de l'eau de terre, par exemple, est suffisante pour neutraliser l'acidité de l'eau de germination, on constate encore que les microbes ne parviennent pas, dans la partie supérieure des tubes, plus vite que dans les témoins. Il faut donc admettre que les racines des légumineuses n'émettent pas, abstraction faite des hydrates de carbone, une substance spécifique capable d'exercer une action chimiotaxique sur les microbes du sol.

Nous aurions pu étudier aussi l'action de quelques sels, en particulier des nitrates, car on se rappelle que nous nous sommes proposé d'expliquer l'influence de ces corps sur la formation des tubercules radicaux. Mais l'explication découle tout naturellement de ce qui précède. Nous n'avons qu'à nous rappeler le rôle physiologique des nitrates dans l'organisme des végétaux ; MM. Low<sup>1</sup> et Otto<sup>2</sup> ont démontré qu'ils sont utilisés dans les feuilles principalement et dans tous les organes en voie de développement. Ils se combinent aux produits résultant de l'assimilation chlorophyllienne pour former des corps quaternaires.

En nous appuyant sur ces observations, nous pouvons affirmer que si la plante trouve dans le sol assez de nitrates pour absorber les hydrates de carbone élaborés par les organes verts, la sève descendante n'en renfermera que très peu, et, par suite, les poils

1. Compte rendu dans les *Annales agronomiques*, t. XVI.

2. *Ber. d. d. bot. Gesellsch.*, t. VIII.

absorbants n'en perdront pas par diffusion; les microbes du sol ne seront pas attirés et il ne se formera pas de nodosités. C'est le cas des terres riches. Les rares tubercules qui peuvent se développer restent chétifs parce qu'ils sont dépourvus d'aliments hydrocarbonés. Au contraire, si le sol renferme peu de nitrates, les hydrates de carbone circulent dans toutes les parties de la plante parce qu'ils sont en excès sur les aliments azotés; ils parviennent ainsi vers les extrémités végétatives des racines, et de là se répandent dans la terre. Les bacilles des légumineuses, attirés par la présence de cet aliment, envahissent les régions pilifères, parce que c'est dans l'intérieur même des cellules que les liquides sont le plus riches en hydrates de carbone, car, évidemment, les mêmes phénomènes que nous avons observés avec nos tubes à chimiotaxie se passent dans la nature.

Nous voyons donc que la question de la symbiose des légumineuses est réglée d'un bout à l'autre par le jeu naturel et simple des forces physiques que la vie met continuellement en action. Les plantes vertes disposent, dans les radiations solaires, d'une source d'énergie inépuisable; mais elles ne peuvent l'utiliser pour triompher de l'inertie de l'azote. On a vu par quel mécanisme les légumineuses y parviennent; grâce à cette propriété, elles sont aussi intéressantes au point de vue biologique qu'au point de vue agricole. Elles peuvent, suivant les conditions, vivre de la vie indépendante des autres plantes supérieures, ou de la vie saprophyte par l'intermédiaire des bacilles, ou bien encore des deux simultanément.

Cette dernière remarque nous permet d'aller au-devant d'une objection qui se présente ici : l'émission d'hydrates de carbone n'est pas particulière aux légumineuses, car ces composés se rencontrent dans tous les végétaux; pourquoi n'y a-t-il pas symbiose avec d'autres plantes? Remarquons que le caractère spécifique des légumineuses ne réside pas dans cette propriété de diffuser des hydrates de carbone, mais bien dans la faculté d'utiliser directement les composés quaternaires fabriqués par les microbes des nodosités aux dépens de l'azote libre.

Toutes les plantes privées de cette propriété se conduisent, vis-à-vis du bacille des nodosités, comme elles se conduisent à l'égard d'un microbe quelconque; elles se défendent par tous les moyens dont elles disposent.

## VI

## CONCLUSIONS

Les microbes des nodosités fixent l'azote libre sans le secours de la plante; il suffit pour cela de les placer dans les conditions les plus favorables à leur développement. Nous avons montré qu'il faut aérer énergiquement les cultures et introduire dans les milieux nutritifs une quantité de saccharose qui ne peut pas être inférieure à 2 0/0.

Le bacille se montre assez exigeant sur la nature de l'azote organique; la légumine lui convient très bien; elle permet au bacille d'utiliser le mieux possible l'énergie latente du saccharose en vue de la fixation de l'azote libre. C'est dans ces conditions seulement qu'il se montre capable de faire la synthèse d'une quantité appréciable de matière azotée.

Le rapport qui existe entre l'azote combiné et le sucre fourni aux microbes influe sur le résultat final. Celui qui nous a donné le meilleur rendement est  $1/200$ ; nous avons plus que doublé la richesse en azote des milieux de culture; le rapport de l'azote fixé au sucre consommé est sensiblement supérieur à  $1/100$ . C'est à peu près le rapport qui existe entre l'azote total et le saccharose dans une betterave à sucre. De cette comparaison, nous avons pu conclure que la fixation de l'azote libre dans nos cultures a été à peu près aussi active que dans les nodosités.

Dès le début de nos expériences, notre attention a été vivement frappée par l'abondance de la mucosité qui se forme dans les cultures; nous avons établi qu'elle ne résulte pas d'une transformation isomérique du saccharose; nous avons constaté qu'il y a une relation étroite entre la quantité d'azote fixée et l'abondance de cette substance dans les cultures; sa solubilité dans l'eau, sa propriété de passer à travers les membranes, son absence dans les nodosités, bien que les bacilles transportés sur des milieux artificiels en élaborent dans les 24 heures, nous ont conduit à la considérer comme une matière azotée provenant de la fixation de l'azote libre, et servant de trait d'union entre



la plante et son hôte. Pour le microbe, c'est un produit de désassimilation, et c'est pour cela précisément que le bacille des nodosités ne peut pas se développer si on ne lui fournit que de l'azote libre. Pour la plante, au contraire, c'est un élément directement assimilable.

En rapprochant les observations de MM. Prazmowski et Prillieux, nous avons pu établir que le pseudo-mycélium des jeunes nodosités n'est pas une forme de transition du microbe des légumineuses. Il résulte d'une accumulation de mucosité autour des coccobacilles qui envahissent les cellules, il disparaît dès que la circulation est assez active pour dissoudre et entraîner cette substance. Ce n'est qu'à partir de ce moment seulement que les formes ramifiées se montrent : nous verrons sous quelles influences elles naissent, en même temps que nous compléterons, dans un troisième mémoire, l'histoire des microbes qui pénètrent dans les racines.

Pour le moment, rappelons que nous avons obtenu dans nos cultures des formations analogues sinon identiques. Rappelons également que ce pseudo-mycélium ne résiste pas aux procédés de préparation microscopique employés pour tous les autres microorganismes. Nous compléterons aussi cette dernière remarque.

L'utilisation du nitrate par les microbes des nodosités nous prouve que la rareté des tubercules radicaux sur les racines des plantes cultivées dans les sols riches en matières azotées n'est pas due à une influence nocive exercée par ces produits sur le développement des microbes. Nous avons montré qu'elle est la conséquence d'une double cause : l'action attractive exercée par les hydrates de carbone mis en liberté dans la région des poils absorbants, et l'influence mutuelle que ces composés et les azotates exercent les uns sur les autres dans les tissus mêmes de la plante.

---

# PRODUCTION DE LA TOXINE DIPHTÉRIQUE

PAR M. LE D<sup>r</sup> LOUIS MARTIN

Chef de laboratoire à l'Institut Pasteur.

---

Plus on avance dans l'étude de la production des toxines et plus on voit que les microbes doivent être cultivés dans des conditions spéciales qu'il importe de bien déterminer lorsqu'on veut qu'ils remplissent au maximum leur fonction toxigène.

## ÉTUDE DES MILIEUX DE CULTURE

§ I. *Influence de l'acidité du milieu.* — Dans leur premier mémoire de 1888, MM. Roux et Yersin <sup>1</sup> obtiennent de la toxine diphtérique en cultivant le bacille diphtérique dans du bouillon de veau peptonisé; ils constatent que le bouillon de culture préalablement alcalin devient acide dans les premiers jours de la culture et redevient alcalin ensuite. Ils démontrent en outre que la toxine se forme au moment où l'acidité diminue, et que son activité augmente en même temps que l'alcalinité.

Ces faits ont été vérifiés par tous les expérimentateurs, qui se sont toujours guidés sur la marche de l'alcalinité dans la préparation de la toxine diphtérique.

Celle-ci apparaît d'autant plus vite que le bouillon redevient plus rapidement alcalin; c'est pour cela que MM. Roux et Yersin ont essayé de diminuer la période d'acidité, en faisant passer un courant d'air sur la culture.

Dans tous les travaux parus depuis lors, on a toujours cherché à expliquer et à éviter la production d'acide.

1. *Annales de l'Institut Pasteur*, décembre 1888.

M. Spronck<sup>1</sup> a accusé la qualité des viandes employées ; tandis que Park et Williams<sup>2</sup> ont insisté sur l'alcalinisation préalable des bouillons.

Dans l'étude qui va suivre, je m'efforcerai de préciser et de compléter les travaux de ces savants, en indiquant de nouvelles causes qui favorisent la formation de la toxine et en signalant les circonstances qui la contrarient.

§ II. *Influence de l'aération des cultures.* — Pour diminuer la durée de la période d'acidité des cultures du bacille diphtérique, MM. Roux et Yersin répartissaient le bouillon peptonisé dans des ballons Fernbach qu'ils ensemençaient et plaçaient à l'étuve pendant 24 heures.

Lorsque la culture était bien développée, ils mettaient les tubulures des ballons en communication avec une trompe aspirante, et de cette façon la culture se trouvait largement aérée ; on obtenait ainsi facilement en 15 jours des toxines actives, au dixième, au vingtième ou même au trentième de c. c., pour un cobaye de 4 à 500 grammes ; tandis qu'il fallait un mois et plus pour obtenir sans courant d'air, avec le même milieu et le même microbe, des toxines aussi actives.

MM. Roux et Yersin indiquaient déjà, dans leur 3<sup>e</sup> mémoire<sup>3</sup>, que les changements dans les réactions sont plus rapides dans les cultures aérées.

Pour préciser la question, j'ai fait plusieurs expériences qui toutes démontrent que le courant d'air diminue la période d'acidité, et par suite permet une production plus hâtive de la toxine lorsque cette période d'acidité existe<sup>4</sup>.

Du reste, les travailleurs qui, après le Congrès de Budapest,

1. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1895.

2. *The Journal of Experimental Medicine*, 1896, p. 4.

3. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1890.

4. Expériences : Prenons deux ballons de même forme, mettons dans chacun la même quantité du même liquide, faisons passer un courant d'air dans l'un et laissons l'autre sans courant d'air.

Après 3 jours { le ballon aéré est alcalin à la phtaléine.  
                          { le ballon non aéré n'est pas alcalin à la phtaléine.

Après 7 jours, les deux ballons sont alcalins à la phtaléine. Mais si nous dosons l'alcalinité, nous voyons que, dans le ballon aéré, 4 litre de bouillon est neutralisé par 32 c. c. d'acide oxalique normal ; dans le ballon non aéré, 4 litre de bouillon est neutralisé par 25 c. c. d'acide oxalique normal.

Voici une autre expérience :

Prenons un bouillon dans lequel le bacille diphtérique ne donne pas d'acide ; si on ajoute de la glycérine, il y aura production d'acide.<sup>5</sup>



ont voulu produire de la toxine diphtérique avec du bouillon peptonisé, ont en général adopté l'emploi du courant d'air qui permettait d'obtenir des toxines plus rapidement et surtout plus régulièrement. Toutefois, en Allemagne, bien des auteurs, avec Aronson<sup>1</sup>, ont affirmé que sans courant d'air on pouvait obtenir rapidement de la bonne toxine.

Cela tenait à ce que dans les milieux qu'ils employaient, le bacille diphtérique ne donnait pas d'acide ou en donnait peu; ces auteurs se servaient surtout de solutions peptonisées d'extraits de viandes.

Il est facile de se convaincre que dans les solutions peptonisées (avec certaines peptones du moins), le bacille diphtérique pousse sans changer la réaction du milieu. Ce fait très important n'a pas attiré l'attention autant qu'il le méritait.

MM. Roux et Yersin font passer de l'air sur leurs cultures pour les rendre plus rapidement alcalines; mais si nous avons des milieux où le bacille diphtérique ne donne pas d'acide, l'emploi du courant d'air sera-t-il encore utile?

Faisons l'expérience: dans les bouillons qui restent constamment alcalins, la toxine apparaît dès les premiers jours; mais, même dans ce cas, les cultures aérées deviennent plus rapidement toxiques.

Après 48 heures, on a, dans les cultures aérées, de la toxine

Dans deux ballons ajoutons 1 0/0 de glycérine.

Après 48 heures de culture { ballon aéré, acidité 8.  
  { ballon non aéré, acidité 29.

Dans deux ballons ajoutons 2 0/0 de glycérine.

Après 48 heures de culture { ballon aéré, acidité 12.  
  { ballon non aéré, acidité 37.

Dans deux ballons ajoutons 5 0/0 de glycérine.

Après 48 heures de culture { ballon aéré, acidité 19.  
  { ballon non aéré, acidité 45.

On voit que, dans tous les cas, la production d'acide est moindre dans les ballons aérés que dans les ballons non aérés.

Les expériences de M. Louis Cobbett publiées dans les *Annales de l'Institut Pasteur*, t. XI, p. 260 arrivent au même résultat.

Si on ajoute à un bouillon qui ne donne pas d'acide 0,15 0/0 de glucose, l'acide le produit et l'alcalinité succède à l'acidité après 8 jours.

Dans les ballons aérés, l'alcalinité est de 15.

Dans les ballons non aérés, l'alcalinité est de 4.

Nous ne voyons pas pourquoi l'auteur conclut que l'influence du courant d'air ne ressort pas clairement de cette expérience; pour la rendre plus probante, il suffirait d'augmenter la dose de glucose et on aurait un bouillon acide dans les ballons sans courant d'air.

1. ARONSON, *Wiener Med. Wochenschr.* 1894. N° 46-48.

active au cinquantième, tandis que le liquide des cultures non aérées tue seulement au dixième. Toutefois, après 4 jours, les cultures non aérées contiennent, elles aussi, des toxines actives au cinquantième.

On voit par cette expérience que l'aération donne un gain de quelques heures ; cette plus grande rapidité dans la production des toxines ne compense pas les complications d'appareillage qu'elle exige.

Mais on sait que la toxine diphtérique s'oxyde facilement ; l'aération, qui, au début, en facilite la production, détruira en partie la toxine formée si elle est prolongée ; aussi, dès le cinquième jour, la toxine diminue dans les cultures aérées, tandis que cette diminution ne devient réellement appréciable qu'après le 8<sup>e</sup> ou le 10<sup>e</sup> jour dans les cultures non aérées.

La conclusion est donc que l'aération des cultures est utile lorsqu'on se sert de milieux de cultures dans lesquels le bacille diphtérique produit des acides ; mais on peut la supprimer lorsqu'on emploie des milieux qui deviennent rapidement alcalins ou mieux qui restent toujours alcalins.

C'est de l'obtention de ces milieux que nous allons nous occuper maintenant.

§ III. *Alcalinisation préalable des milieux.* — C'est certainement avec le mémoire de Park et Williams<sup>1</sup> qu'un grand progrès a été réalisé dans la production des toxines diphtériques.

Avant ces savants, on avait des toxines actives au 1/10, au 1/20 ou au 1/30 de centimètre cube ; ils ont obtenu une toxine active au 1/100 et même au 1/200.

Kossel<sup>2</sup>, quelques mois après, fait paraître un travail sur la production des toxines ; ses résultats sont semblables à ceux des auteurs précédents.

D'après Park et Williams, pour obtenir des toxines très actives, il faut bien alcaliniser les bouillons de culture ; voici du reste leurs conclusions : « Les meilleurs résultats sont obtenus avec du bouillon qui, après avoir été neutralisé, est additionné d'environ 7 c. c. de soude normale par litre. »

Pour neutraliser le bouillon, on se sert, comme indicateur, de

1. *The Journal of Experimental Medecin*, vol. 4, pag. 4.

2. KOSSEL, *Centralblatt für Bact., Abth. I* 1896.

la teinture de tournesol; le mieux est de préparer un tube témoin contenant de l'eau distillée et de la teinture de tournesol amenés à la teinte sensible; c'est à ce tube témoin qu'on comparera le tube de bouillon.

Si l'on se sert de papier de tournesol, il faut qu'il soit bien sensibilisé; il est plus sûr de le préparer soi-même.

Quand le bouillon est neutre au tournesol, on doit ajouter, par litre de bouillon peptonisé à 2 0/0, 7 c. c. de soude normale.

Autrefois on disait que le bouillon, pour donner une bonne toxine, devait être alcalin au tournesol et acide à la phtaléine; il est facile de se convaincre que l'alcalinité réclamée par Park et Williams correspond à cette réaction; mais nous devons savoir gré aux auteurs d'avoir précisé les conditions de l'alcalinisation.

Toutefois, si cette règle doit être absolument observée, on ne peut pas dire, comme Park et Williams, que « l'abondance de la culture et la production de la toxine dépendent plus de la réaction du bouillon que de toute autre chose ». En ne tenant compte que de l'alcalinité du milieu, on a dans les premiers jours une production d'acide, comme en témoigne le tableau ci-joint emprunté au mémoire de Park et Williams.

TABLEAU VII

MONTRANT LA RELATION ENTRE LA RÉACTION DU BOUILLON DE CULTURE  
ET LA QUANTITÉ DE TOXINE

CULTURES DU BACILLE N° 8	1 <sup>er</sup> JOUR		2 <sup>e</sup> JOUR		3 <sup>e</sup> JOUR		4 <sup>e</sup> JOUR	
	Réaction.	Toxicité.	Réaction.	Toxicité.	Réaction.	Toxicité.	Réaction.	Toxicité.
1 0/0 peptone, 0 c. c. alcali.	acide.	léger œdème.	acide.	mort en 4 j. 1/2	neutre.	mort en 40 heures.	neutre.	—
1 0/0 peptone, 5 c. c. alcali.	acide.	léger œdème.	acide.	mort en 24 heures.	alcaline.	mort en 23 heures.	alcaline.	—
2 0/0 de peptone, 0 c. c. alcali.	acide.	léger œdème.	acide.	mort en 5 jours.	acide.	mort en 40 heures.	acide.	—
2 0/0 de peptone, 5 c. c. alcali.	acide.	mort en 3 jours.	acide.	mort en 40 heures.	alcaline.	mort en 40 heures.	alcaline.	—



Enfin, dans certains cas, on constate des irrégularités dans la production de la toxine.

Voici des exemples empruntés au mémoire de Park et Williams :

« Sur 14 lots examinés, dans tous, sauf dans trois, la production des toxines est rapide.

« Dans un lot, la culture du bacille et la production de la toxine ont été extrêmement intéressantes, étant tout à fait semblable à la description classique donnée par MM. Roux et Yersin.

« Durant le premier jour, les bacilles ont poussé vigoureusement et une pellicule assez épaisse s'est formée.

« Après 24 heures, la réaction alcaline du début était changée en une légère acidité; la culture du bacille diminuant, la pellicule tombait partiellement au fond du vase de culture et ne se reformait pas immédiatement; ces conditions se maintiennent jusqu'au 12<sup>e</sup> jour où l'acidité commençait à diminuer; au 16<sup>e</sup> jour, la pellicule était reformée, le bouillon était trouble et alcalin.

« Il n'y avait pas de toxine au 12<sup>e</sup> jour, il y avait de la toxine forte au 18<sup>e</sup>.

« Dans deux autres échantillons, la culture restait acide et il n'y eut pas de toxine formée <sup>1</sup>. »

Lorsqu'on étudie de plus près la production de la toxine diphtérique, on voit que des bouillons parfaitement alcalinisés se refusent parfois à donner de la toxine.

Pour éviter ces accidents, il faut supprimer la période d'acidité. Voyons s'il existe un milieu dans lequel le bacille diphtérique pousse sans donner d'acide à aucun moment et en produisant de la toxine.

§ IV. *Préparation d'un milieu favorable à la production de la toxine diphtérique.* — M. Spronck <sup>2</sup> a indiqué dans son mémoire que, dans les bouillons d'extraits de viande, le bacille diphtérique ne donne pas d'acide; malheureusement les extraits de viande ne se ressemblent pas, et les peptones qu'on y ajoute contiennent

1. Je tiens à remercier M<sup>lle</sup> Williams de l'amabilité avec laquelle elle a bien voulu me donner une culture de son microbe toxigène (n° 8); c'est ce bacille qui est désigné dans le cours de ce travail sous le nom de microbe américain.

2. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1895.

quelquefois des produits qui permettent la production d'acide.

Avec ces substances qu'il ne peut fabriquer lui-même, l'expérimentateur n'est jamais sûr du résultat.

Voici un bouillon que tout le monde peut préparer, dans lequel le bacille ne donne jamais d'acide et cependant pousse assez abondamment.

*Bouillon d'estomac de porc.* — C'est une eau peptonisée qu'on fabrique soi-même avec des estomacs de porcs; ces estomacs, appelés panes dans le commerce, nous fournissent ce que nous appellerons pour plus de simplicité le *bouillon de panse*.

Pour l'obtenir, nous prenons des estomacs de porcs et nous broyons ou hachons ensemble les tuniques muqueuse et musculaire. Pour éviter autant que possible les variations qui pourraient survenir par suite de la quantité variable de pepsine de chaque estomac, nous prenons ordinairement cinq panes, pour une opération.

Plaçons ce hachis dans l'eau acidulée à 50°, dans les proportions suivantes :

Hachis d'estomac de porc.....	200 grammes.
Acide chlorhydrique pur.....	10 —
Eau à 50°.....	1000 —

L'eau doit être maintenue à 50°, car à cette température la pepsine de la muqueuse stomacale digère plus activement les tissus et les transforme en peptone <sup>1</sup>.

Après 12 heures, l'opération est généralement terminée; on peut sans inconvénient attendre 24 heures : dans ce milieu très acide, il ne se développe pas de microbes. Lorsque la digestion est achevée, on chauffe le bouillon d'estomac de porc à 100°, on détruit ainsi la pepsine en excès; puis on le passe au tamis, ou mieux on le filtre sur une couche de coton hydrophile peu épaisse et peu serrée, on chauffe le liquide filtré et on l'alcalinise au moment où le liquide atteint environ 80°.

Dans le liquide, de gros flocons se forment qui le clarifient.

Après l'alcalinisation, il est utile de filtrer le bouillon sur

1. On peut sans inconvénient, pour améliorer le milieu et l'adapter à certains microbes, mettre à digérer des organes, par exemple du poumon, des intestins, du placenta ou des muscles; il y a suffisamment de pepsine pour digérer les fibres de l'estomac et les autres matières albuminoïdes.

papier; il faut ensuite chauffer à 120°, filtrer sur papier, répartir dans les vases de culture qu'on stérilise en chauffant 1/4 d'heure à 115° 1.

Le liquide obtenu par cette auto-digestion de l'estomac est une véritable solution de peptone, dans laquelle le bacille diphthérique se développe bien sans fournir d'acide; la peptone ainsi préparée donne des résultats plus constants que les peptones commerciales dont la composition est si variable 2.

Avec ce milieu, on obtient de la toxine dont 1/100 de centimètre cube tue un cobaye de 500 grammes; toutefois, si on lui ajoute de la macération de viande, la toxine est plus active encore.

L'addition de 2 grammes d'acide acétique par litre avant l'alcalinisation rend le milieu plus favorable à la production de la toxine. Le mélange de bouillon de panse et de macération de viande est encore préférable.

Il est à désirer que l'on arrive à supprimer tout à fait l'emploi de la viande, dont les inconvénients sont nombreux, comme nous allons le voir.

*Macération de viande.* — Tous les expérimentateurs sont d'accord pour rejeter la viande de cheval qui ne donne pas des résultats aussi réguliers que la viande de bœuf ou de veau. Je me suis servi surtout de viande de veau. Mais faut-il employer des viandes très fraîches ou très anciennes?

C'est M. Spronck qui le premier a eu le mérite d'attirer l'attention sur ce fait que les bouillons obtenus étaient très différents suivant l'état de la viande employée. D'après

1. Quelquefois le bouillon de panse est louche; si on chauffe à 120° cela n'a pas d'importance, car le bouillon se clarifie à l'autoclave. Si on veut seulement chauffer à 100°, il faut avoir soin de bien écumer le bouillon comme on écume un pot-au-feu, puis on le laisse refroidir et on enlève la graisse solide qui surnage. Si, malgré ces précautions, le liquide était louche, on le clarifierait sûrement en ajoutant, avant de l'alcaliniser, un fragment de chlorure de calcium et immédiatement après un morceau de phosphate de soude.

Une pratique meilleure est de chauffer la macération d'estomac de porc tous les deux jours à 100°; après trois ou quatre chauffages, le liquide se clarifie très facilement.

2. Dans le milieu ainsi préparé, plusieurs microbes se développent bien.

M. Salimbeni s'est assuré que le vibrion cholérique y pousse abondamment et y donne la réaction du roth-choléra.

J'ai constaté que le *bactérium coli* y donne aussi la réaction de l'indol.

Ce milieu peut se préparer d'avance, il est peu coûteux; son usage rendra des services dans les laboratoires.



M. Spronck <sup>1</sup>, « si la viande est toute fraîche, le bacille diphtérique transforme rapidement le milieu alcalin en milieu acide, ce milieu devient de plus en plus acide et reste acide.

« Si la viande a séjourné quelques jours chez le boucher, elle contient moins de glucose ; la culture du bacille dans ce milieu est d'abord acide, mais devient ensuite alcaline comme dans les expériences de MM. Roux et Yersin.

« Enfin si le boucher fournit une viande ancienne dégageant une légère odeur, on obtient avec cette viande un milieu très favorable pour la production d'une toxine active, car dans ce milieu la culture ne devient jamais acide. »

Toutes ces expériences de M. Spronck sont faciles à répéter, cependant je ne voudrais pas affirmer que les viandes très fraîches soient moins favorables à la production des toxines que les viandes de deux ou trois jours. En effet, M. M. Nicolle <sup>2</sup> conseille d'employer de la viande d'un animal qui vient d'être abattu, pour obtenir de la bonne toxine.

Comme M. Nicolle, j'ai pu obtenir de la toxine active avec des viandes très fraîches ; mais à Paris on éprouve de grandes difficultés pour obtenir de la viande du jour.

Ainsi que l'a dit M. Spronck, avec la viande putréfiée, on a des cultures qui restent constamment alcalines et poussent bien. Mais à quel moment faut-il arrêter la putréfaction ? Dans quelles conditions doit-elle s'opérer ? M. Spronck n'a pas donné de règles fixes, il a simplement indiqué que cette putréfaction devait détruire les sucres de la viande.

Pour arriver rapidement au même résultat, M. Roux nous a conseillé d'employer une viande fermentée ; pour cela, il nous faisait ajouter à la macération de viande de la levure et le tout était porté à l'étuve à 35° ; il est facile, toutefois, de se convaincre qu'il est inutile d'ajouter de la levure et qu'il suffit de placer la macération de viande 20 heures à l'étuve à 35° ; on obtient avec cette macération un bouillon qui ne donne pas d'acide lorsqu'on l'ensemence avec du bacille diphtérique.

Ce procédé n'est qu'une modification de celui de Spronck, mais il est plus simple et plus rapide.

Après de nombreux essais comparatifs, la macération de

1. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1895.

2. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1896.

viande faite à la température de 35° s'est toujours montrée supérieure aux autres milieux ; depuis que nous employons ce procédé, jamais nous n'avons eu d'acidité dans les cultures. Toujours le développement du bacille a été abondant et la production de la toxine rapide et régulière.

Voici la technique que nous conseillons de suivre : hacher de la viande de veau, mettre 500 grammes de ce hachis par litre d'eau et placer le tout à l'étuve à 35° pendant 20 heures ; exprimer la viande et, au liquide recueilli, ajouter 5 grammes de sel marin par litre, peptoniser, alcaliniser et stériliser.

Nous avons déjà dit quel était le meilleur moyen pour alcaliniser le bouillon, voyons quelle peptone il faut ajouter.

*Peptonisation.* — Je n'apprendrai rien à personne en disant que les peptones sortant d'une même fabrique ont rarement la même composition ; j'ai utilisé les échantillons les plus variés. De tous ces essais, je pourrais conclure qu'il y a des peptones commerciales qui donnent le plus souvent de fortes toxines ; mais de temps en temps, même pour les marques les meilleures, on trouve des échantillons qui ne fournissent plus d'aussi bons résultats : aussi vaut-il mieux préparer soi-même la solution de peptone.

Voici comment je procède :

Je prends 1 litre de macération de viande de veau fermentée à 35° et j'ajoute 5 grammes de sel marin.

A cette macération de viande, je mélange 1 litre de la solution de peptone déjà alcalinisée, filtrée et préparée comme il a été dit plus haut avec les estomacs de porcs.

Quand on a mélangé par parties égales la macération de viande à 35° et le bouillon de panse de porc, on chauffe le mélange à 70° jusqu'à coagulation des matières albuminoïdes, on filtre sur papier, on alcalinise et on stérilise.

*Stérilisation.* — Dans tous nos essais, nous avons vu qu'on obtient un très bon milieu en chauffant ce mélange à 70°, en l'alcalinisant comme l'indiquent Park et Williams, et en le stérilisant par filtration sur bougie Chamberland.

*Jusqu'ici c'est le milieu qui nous a paru le plus satisfaisant.*

C'est avec ce milieu que nous avons obtenu des toxines tuant au 1/500, soit à 0 c. c. 002, les cobayes de 500 grammes.

C'est dans ce milieu que nous ensemençons les microbes

qui donnent une culture peu abondante ou qui poussent en profondeur, pour qu'ils s'habituent à pousser en surface. Ils s'adaptent très vite à ce milieu, s'y régénèrent et font une toxine active.

Je pourrais citer de nombreuses expériences<sup>1</sup> qui démontrent que les milieux chauffés à 120° sont moins bons pour produire la toxine diphtérique que les milieux chauffés à 70° et filtrés.

Quand on ne peut pas employer ce procédé, on se trouvera bien de stériliser les milieux en les chauffant trois fois à 100°.

Disons toutefois que le milieu fabriqué comme nous l'avons indiqué donne encore de très bons résultats, même lorsqu'il est chauffé à 120°.

Les cultures s'y font en voile. Un milieu dans lequel le bacille diphtérique ne pousse pas facilement en voile, dès le début, ne convient pas pour la préparation rapide de la toxine.

#### ÉTUDE DU BACILLE DIPHTÉRIQUE

§ I. *Caractères des cultures.* — Lorsqu'on ensemence le milieu, préparé comme nous venons de l'indiquer, avec du bacille diphtérique, la culture est abondante dès les premières 24 heures et un voile se forme à la surface. Au commencement du second jour, le voile est en général continu et assez épais.

Si les bacilles employés ne sont pas encore bien habitués à vivre en dehors de l'organisme, le voile n'apparaît quelquefois qu'après 36 heures.

Un microbe qui ne forme pas de voile doit être rejeté.

Quand une culture marche bien, le voile tombe le 3<sup>e</sup> jour par lambeaux qui gagnent le fond du vase. En général un nouveau voile remplace progressivement le premier et s'immerge à son tour. Au 6<sup>e</sup> jour, le voile ne se reforme plus.

#### 4. Expérience :

Milieu chauffé à 70°, filtré.			Milieu chauffé à 120°.		
Après {	1/10	meurt en 36 heures	{	1/10	} ne meurent pas.
48 heures {	1/50	meurt en 3 jours	{	1/50	
d'étuve. {	1/100	meurt en 6 jours	{	1/100	} meurt en 3 jours.
A 1 res {	1/50	meurt en 4 jours	{	1/50	
4 jours {	1/100	meurt en 3 jours	{	1/100	} ne meurt pas.
d'étuve. {	1/200	meurt en 15 jours	{	1/200	

Si nous étudions la réaction du milieu, nous voyons que jamais il ne devient acide au tournesol et qu'il est alcalin à la phtaléine le 2<sup>e</sup> ou le 3<sup>e</sup> jour de la culture, au plus tard le 4<sup>e</sup> jour.

Enfin la production de la toxine est très rapide; on a facilement une toxine active au 1/10 après 30 heures et au 1/30 de centimètre cube après 48 heures de culture.

Le maximum de toxicité de la culture est atteint du 5<sup>e</sup> au 7<sup>e</sup> jour, elle tue alors un cobaye de 500 grammes à la dose de 1/200 de c. c., soit 0 c. c. 005.

Après ce temps, la toxine n'augmente plus dans la culture: le 10<sup>e</sup> jour, elle diminue.

Tels sont les résultats obtenus avec le milieu dont nous avons décrit la préparation, et avec des races de bacilles très aptes à produire de la toxine.

§ II. *Bacilles toxigènes.* — Avant le mémoire de Park et de Williams, on regardait comme un résultat satisfaisant l'obtention régulière d'une toxine active au 1/20 ou au 1/30 de centimètre cube. Après que ces auteurs eurent préparé un poison diphtérique mortel au 1/200 de centimètre cube, on ne pouvait se contenter des toxines anciennes.

M<sup>lle</sup> Williams avait bien voulu me remettre le bacille qui avait servi à ses expériences et, en me conformant aux indications des savants américains, je préparai facilement un poison aussi actif que le leur.

Pendant longtemps, le bacille américain fut le seul à me donner ce résultat; tous les bacilles isolés par moi, cultivés dans des bouillons préparés comme l'indiquent Park et Williams, donnaient une toxine beaucoup plus faible.

J'en vins à penser que le bacille de Park et Williams appartenait à une race plus toxigène que nos bacilles ordinaires: cette idée paraissait d'autant mieux fondée que Park et Williams eux-mêmes, sur plus de trente échantillons examinés, n'avaient trouvé aucun autre bacille aussi bon producteur de toxine.

Toutefois, le bacille américain ne donne pas toujours un poison aussi fort; cultivé dans du bouillon préparé et alcalinisé comme le veulent Park et Williams, il le rend acide au tournesol pendant les deux ou trois premiers jours, puis il devient alcalin à la phtaléine vers le quatrième jour environ; c'est à ce moment que la toxine se forme en abondance. Cependant, il arrive que



certaines cultures se maintiennent acides beaucoup plus longtemps, et alors la production de la toxine est tardive et moins considérable.

Le microbe qui vient de ces cultures paraît modifié et, ensemené de nouveau, il produit moins de poison.

Lorsque je me suis servi de bouillon de viande macérée à 35°, additionnée de peptone d'estomac de porc, qui à aucun moment ne devient acide, ces irrégularités ont disparu.

Il est donc évident que la courte période d'acidité du début de la culture est nuisible, et qu'elle peut modifier un microbe aussi bien adapté à la production de la toxine que le bacille américain.

A plus forte raison devait-elle agir sur les bacilles que j'isolais des cas de diphtérie à Paris, et qui sont de moins bons producteurs de toxine.

J'ai donc repris les essais avec le milieu, macération de viande à 35° et bouillon de panse.

Sur vingt bacilles provenant de la gorge de vingt enfants diphtériques pris sans choix, treize me donnèrent des toxines tuant le cobaye de 500 grammes à moins de 1/100 de centimètre cube.

Les cultures étaient en tout semblables à celles du bacille américain.

Pour bien m'assurer que le passage dans un bouillon où le bacille donne de l'acide modifie rapidement le pouvoir toxigène, j'ai ensemencé un bacille diphtérique dans du bouillon ordinaire; la toxine obtenue était active au 1/10, tandis que le même bacille, poussé dans le mélange de macération et panse, fournissait en cinq jours une toxine active au 1/30.

La différence s'accroissait encore si on répétait plusieurs fois de suite les cultures dans ces mêmes milieux.

Ce fait explique bien des échecs, et montre que la fonction toxigène d'un microbe est fragile.

La production de la toxine ne se faisant pas, ou se faisant mal, lorsque les milieux deviennent acides, déterminons, si cela est possible, quels corps favorisent l'acidité des milieux; cette étude nous permettra peut-être d'aborder l'influence de ces différents produits sur la fonction toxigène.

§ III. *Causes qui favorisent la production d'acidité.* — Plusieurs

fois dans son mémoire, M. Spronck attribue l'acidité des cultures diphtériques à la transformation des sucres contenus dans la viande. MM. Flügge <sup>1</sup>, Roux et Yersin ont indiqué que le bacille diphtérique donne une acidité plus prononcée dans les milieux glycinés que dans les milieux ordinaires.

La viande de cheval, a-t-on dit <sup>2</sup>, est moins favorable à la production de la toxine, parce qu'elle renferme une plus grande quantité de glycogène.

Le milieu de panse, préparé comme nous l'avons indiqué et dans lequel le bacille diphtérique ne donne pas d'acide, nous permettra de distinguer les substances que le bacille diphtérique transforme en acide.

Avec le docteur Louis Momont, nous avons ajouté divers sucres au bouillon, à la dose de 5 grammes pour 1,000, et nous avons noté ceux qui donnaient lieu à la production d'acide; ce sont :

La glucose, la lévulose, la saccharose, la glycérine, la galactose.

Au contraire, le glycogène, l'amidon, la lactose, la maltose, la raffinose, l'arabinose, l'érythrite, la dulcité et la mannite ne provoquent pas l'apparition de l'acidité.

Quand on fait des expériences comparatives, on voit que les milieux additionnés de lévulose et de glucose sont ceux qui deviennent le plus rapidement acides; les milieux à la glycérine et à la saccharose viennent ensuite, et enfin ceux à la galactose.

Dans le bouillon ordinaire, il y a beaucoup moins de glucose que dans le milieu panse-glucose, et cependant l'acidité s'y montre plus rapidement.

L'expérience nous a montré que le glycogène ne modifie pas la réaction du milieu, ce n'est donc pas le glycogène de la viande en tant que glycogène qui produit l'acidité.

La viande de cheval n'est donc pas un mauvais milieu parce qu'elle contient du glycogène, mais sans doute parce que celui-ci, au cours de l'expérience, se transforme en un corps capable de donner de l'acide, probablement en glucose.

La raison pour laquelle M. Nicolle obtient de bonne toxine

1. Cité par MM. ROUX et YERSIN, *Annales de l'Institut Pasteur*, 1890, 3<sup>e</sup> mémoire.

2. SMIRNOW, *Berliner klinische Woch.*, 1895, n<sup>o</sup> 30. — NIEBEL, *Zeitschr. für Fleisch und Milch. Hygiene*, 1892.

avec de la viande fraîche est que celle-ci renferme du glycogène non encore devenu glucose.

§ IV. *Modifications des fonctions toxigènes. Atténuation.* — Il nous est facile maintenant d'étudier l'influence de l'acidité du milieu sur la fonction toxigène du bacille diphtérique.

Faisons une culture dans du bouillon de panse-lévulose de notre bacille le plus toxigène, le bacille américain; et après 48 heures, quand le milieu est franchement acide, ensemençons un peu de cette première culture dans un second tube contenant aussi de la panse-lévulose. Au bout de cinq passages, le bacille reporté dans le milieu le plus favorable à son développement pousse mal et ne donne un voile qu'après la 48<sup>e</sup> heure, il produit encore de la toxine, mais plus tardivement que la culture témoin.

Si on maintient le bacille américain 20 jours dans le milieu panse-lévulose et qu'après on le transporte dans un milieu très favorable à son développement, sa culture est encore complètement modifiée; la culture est mauvaise, avec un voile grêle se formant vers la fin du 3<sup>e</sup> jour.

Après 48 heures, un dixième de centimètre cube est inoffensif pour le cobaye; au même moment une culture témoin donne déjà une toxine active au 1/50.

Au 5<sup>e</sup> jour, la culture filtrée tue difficilement au 1/50 de centimètre cube, tandis que les cultures témoins sont actives au 1/200.

Cette expérience prouve qu'on peut diminuer la propriété toxigène du bacille américain, mais il faut laisser séjourner longtemps ce bacille dans les milieux défavorables; ce bacille est depuis plus d'un an dans les laboratoires; il a été sélectionné en vue d'une production rapide de toxine, et il ne perd que difficilement son pouvoir toxigène.

La diminution du pouvoir toxigène est beaucoup plus marquée lorsqu'on opère sur des microbes venant de la bouche des enfants.

Lorsqu'on prend de la semence dans une même colonie poussée sur sérum, provenant directement de la bouche des enfants, et qu'on la porte dans le milieu panse-lévulose et parallèlement dans le mélange bouillon et panse, on voit qu'après un séjour de 4 jours à l'étuve, soit après deux passages dans ces

milieux, le bacille qui a vécu dans le milieu qui reste alcalin donne une toxine active au 1/50, tandis que celui qui a passé dans le milieu qui devient acide fournit une toxine qui ne tue pas toujours au 1/10 de centimètre cube. Cependant les deux échantillons de bacilles font périr dans le même temps des cobayes auxquels on l'inocule à la même dose.

Lorsqu'on possède un bacille diphtérique très toxigène, il ne faut donc pas le conserver dans les bouillons où il produit de l'acide, et le milieu qui nous a paru le meilleur pour conserver au microbe ses fonctions toxigènes est encore celui que nous avons indiqué comme milieu de choix pour la production de la toxine.

C'est donc dans le mélange de macération de viande et de bouillon de panse chauffé à 70° et filtré sur bougie Chamberland que nous conservons nos bacilles toxigènes.

Les cultures doivent être placées à l'étuve entre 33° et 35°.

Après 8 jours de culture, les semences sont retirées de l'étuve et conservées à l'abri de la lumière.

Si, par accident, un bacille s'atténue, il suffit de reprendre une de ces vieilles cultures, de la rajeunir par deux ensemencements successifs, et on a ainsi une nouvelle souche de bacille toxigène; comme l'a très bien indiqué M. Behring<sup>1</sup>, ces vieilles cultures rajeunies fournissent parfois des microbes très toxigènes.

*Augmentation du pouvoir toxigène.* — Nous venons de voir qu'un microbe peut perdre en partie ses fonctions toxigènes; ne peut-on pas remonter le pouvoir toxigène comme on a pu remonter la virulence?

Examinons rapidement les moyens de remonter la virulence du bacille diphtérique.

MM. Roux et Yersin<sup>2</sup> ont signalé l'association du bacille diphtérique avec le streptocoque.

M. Bardach<sup>3</sup> a surtout étudié les passages chez le chien.

M. Trumpp<sup>4</sup> a injecté, en même temps que le microbe non virulent, de la toxine diphtérique, et le bacille retiré du point d'inoculation tuait le cobaye.

1. *Deutsche med. Woch.*, 1893.

2. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1890.

3. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1895, page 40.

4. *Cent. f. Bact.* XX, page 721.



J'ai surtout étudié le passage en sac de collodion dans le ventre des lapins, d'après la méthode indiquée dans le mémoire de MM. Metchnikoff, Roux et Salimbeni sur le choléra<sup>1</sup>; dès les premiers passages, un bacille qui ne tuait pas le lapin, mais tuait le cobaye, a été rendu virulent pour le lapin.

Ce passage en sac de collodion dans le ventre du lapin est aussi le procédé qui m'a fourni les meilleurs résultats pour l'augmentation du pouvoir toxigène.

Avec le bacille tuant régulièrement le cobaye en 24 heures et donnant seulement une toxine active au 1/10, j'ai pu obtenir après 6 passages en sac placés dans le ventre du lapin une toxine active au 1/50.

De même avec le bacille américain qui donnait, au moment où j'ai fait les passages, une toxine active au 1/100, j'ai obtenu une toxine active au 1/500.

Dans tous ces passages en sac dans le ventre du lapin, la virulence pour le cobaye n'a pas changé.

Le bacille 261 tue depuis 5 ans le cobaye en 24 heures, lorsqu'on injecte un centimètre cube d'une culture en bouillon âgée de 24 heures et, cependant, pendant ce temps, son pouvoir toxigène a considérablement varié.

Le bacille américain n° 8 de Park et Williams, dans les mêmes conditions, tue le cobaye entre 30 et 36 heures, et cependant il a donné des toxines actives au 1/500 sans augmenter de virulence.

§ V. *Bacilles non virulents, mais toxigènes.* — En possession d'un bon milieu de culture permettant au microbe de sécréter facilement sa toxine, et de plus connaissant comment on doit cultiver un microbe pour lui conserver ses fonctions toxigènes, il importait de reprendre une expérience tentée autrefois avec de mauvais milieux.

J'avais cherché au mois de décembre 1895 si un microbe non virulent<sup>2</sup> pour le cobaye donnait de la toxine, j'avais sans résultat injecté de 1 à 5 c. c. de culture filtrée.

Et cependant le bacille 261, qui pendant longtemps a été pour nous le microbe le plus toxigène, ne tue pas le lapin lorsqu'on in-

1. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1896.

2. Pour apprécier la virulence d'un bacille, j'injecte à l'animal 1 c. c. d'une culture de 24 heures.

jecte 1 c. c. d'une culture de 24 heures, mais il sécrète une toxine qui à la dose de 1 c. c. tue rapidement le lapin.

Il est bien probable que, parmi les bacilles qui ne tuent pas le cobaye, il en existe cependant qui sécrètent une toxine capable de tuer cet animal.

Pour faire cette expérience, j'ai pris 7 microbes provenant de la gorge d'enfants malades, qui ne tuent pas le cobaye lorsqu'on injecte sous la peau 1 c. c. d'une culture de 24 heures.

J'ai aussi essayé le bacille 261 court qui est un bacille atténué dérivant du n° 261, bacille très virulent et toxigène. Ce bacille s'est spontanément atténué et en même temps est devenu très court.

Ces 8 échantillons injectés sous la peau d'un cobaye ne le tuent pas.

Un seul, le n° 1, donne de l'œdème et une légère escarre au point d'inoculation ; les autres ne donnent aucune lésion locale. Et cependant tous ces microbes produisent de la toxine comme on peut le voir d'après le tableau suivant :

	CULTURE.	TOXINE.
N° 1.....	œdème-lég. escarre.	1 c. c. tue en 30 heures. $\frac{1}{10}$ c. c. — 40 heures.
N° 2.....	Rien.	1 c. c. — 5 jours.
N° 3.....	Rien.	1 c. c. — 5 jours.
N° 4.....	Rien.	1 c. c. — 10 jours.
N° 5.....	Rien.	1 c. c. — 24 jours.
N° 6. (261 court) . . .	Rien.	1 c. c. — 13 jours.
N° 7.....	Rien.	1 c. c. — 22 jours.
N° 8. (1).....	Rien.	2 c. c. — 6 jours.

Comme en témoigne le tableau ci dessus <sup>2</sup>, tous les microbes essayés ont donné de la toxine.

1. Ce bacille retiré de Gustave Aubry n'est pas virulent, ne donne pas d'acide dans le bouillon ordinaire et il est court ; ce garçon est entré à l'hôpital un jour après sa sœur, Germaine Aubry, qui avait un bacille morphologiquement semblable ; mais il était virulent, il produisait une toxine active à  $\frac{1}{50}$  et donnait de l'acide dans le bouillon ordinaire.

2. Avec ces mêmes microbes, j'ai fait l'expérience que M. Spronck, dans la *Semaine médicale* du 29 septembre 1897, regarde comme décisive pour séparer les bacilles diphtériques des pseudo-diphtériques.

Le 7 octobre 1897, à 4 heures du soir, j'ai injecté sous la peau de huit cobayes

Le n° 1 sécrète beaucoup de poison puisque sa toxine tue en 40 heures à la dose de 1/10 de c. c.

Le n° 5 est de beaucoup le moins toxigène, puisqu'il a fallu 24 jours pour tuer un cobaye.

Il est probable qu'on trouvera des microbes moins toxigènes encore.

Les lésions des cobayes morts rapidement étaient bien celles de la diphtérie, et je me suis assuré que le sérum antidiphtérique neutralise ces toxines et empêche les cobayes de mourir.

Cette expérience est pleine d'enseignements. Nombre d'auteurs désignent, sous le nom de pseudo-diphtériques, des bacilles morphologiquement semblables au bacille diphtérique, et qui n'en diffèrent que par leur manque de virulence pour le cobaye; au lieu d'admettre avec MM. Roux et Yersin que ces bacilles sont des races atténuées du bacille diphtérique vrai, ils soutiennent qu'ils n'ont rien de commun avec lui.

Sur les huit échantillons de bacilles qui ont servi aux expériences précédentes, sept sont tout à fait inoffensifs pour le cobaye, ils rentreraient donc dans la catégorie des bacilles pseudo-diphtériques, et cependant tous donnent de la toxine capable de tuer les animaux, et de plus le sérum antidiphtérique se montre le contre-poison de cette toxine.

Ces faits suffisent à établir combien est artificielle la dis-

1/2 c. c. de sérum préventif au 1/150,000 et antitoxique à 200 unités par centimètre cube.

Le 8 octobre, à 4 heures du soir, j'ai injecté, sous la peau, 2 c. c. d'une culture de 24 heures (j'ai pris 2 c. c. comme l'indique M. Spronck).

	Le 9 octobre 3 heures du matin	12 h.	6 h.	10 octobre.
1.....	OEdème	oedème	oedème	OEdème qui persiste
2.....	Très léger oedème	Disparaît	Rien	Rien
3.....	OEdème	Léger	Léger	Léger oedème
4.....	Rien	Rien	Rien	Rien
5.....	Très léger oedème	Léger	Léger	Rien
6. (261 court)....	Léger oedème	Léger	Léger	Léger oedème, devient dur
7.....	Léger oedème	Léger	Léger	Léger oedème
8.....	Léger oedème	Léger	Léger	Rien

Pour M. Spronck, un seul bacille serait diphtérique, le n° 4. De beaucoup e moins diphtérique serait le n° 1, qui cependant donne une toxine active à 1/10 influencée par le sérum.

inction absolue que l'on veut trouver entre les bacilles diphtériques vrais et les bacilles pseudo-diphtériques.

On a souvent observé que des diphtéries d'allures bénignes se terminaient par une syncope mortelle : la bactériologie nous fournit l'explication de ces faits en nous montrant que des microbes peu virulents peuvent sécréter de la toxine; la sécrétion sera lente, l'empoisonnement sera moins rapide, mais ses conséquences n'en seront pas moins fatales.

Il faut donc, dans l'intérêt du malade et pour se conformer aux faits, cesser d'attacher une grande importance à ces distinctions subtiles de bacilles diphtérique et pseudo-diphtérique, et regarder comme atteints de diphtérie tous les malades dont l'exsudat ensemencé fournit sur sérum, en 24 heures, de nombreuses colonies de bacilles ayant l'aspect et les réactions colorantes de celui la diphtérie.

En agissant ainsi, le médecin s'évitera de pénibles surprises.

§ VI. *Conséquences pour la production du sérum antidiphtérique.*

— Quand on a pu obtenir des toxines très actives, on a pensé qu'avec ces toxines les propriétés préventives et antitoxiques du sérum allaient immédiatement augmenter.

Nous allons voir que l'augmentation s'est faite, mais lentement et progressivement.

Les sérums, au moment où j'ai employé la nouvelle toxine, étaient, pour l'ensemble des chevaux, préventifs au 1/50000 et avaient 100 unités antitoxiques.

Sous l'influence de la nouvelle toxine, ils sont devenus rapidement préventifs au 1/100000, puis antitoxiques à 150 unités et enfin à 200 unités par centimètre cube.

Dans un lot de 20 chevaux, on en trouvait d'abord un ou deux qui se maintenaient à 200 unités; après une nouvelle injection de toxine, sur 20 chevaux, la moitié donnait un sérum possédant les 200 unités, et finalement huit mois après l'emploi de la nouvelle toxine, la grande majorité des chevaux possèdent les 200 unités antitoxiques.

Si on remarque que les nouvelles toxines sont environ dix fois plus actives que les toxines anciennes, on voit que les sérums ne se sont pas améliorés dans la même proportion.

Des toxines dix fois plus actives ont permis d'obtenir des sérums seulement deux fois plus actifs.



On trouve cependant, dans un lot de chevaux, certains animaux qui, parfois, donnent des sérums préventifs au 1/150000 et antitoxiques à 300 unités.

Il faut espérer que, dans la suite, les sérums gagneront et profiteront plus encore de la grande activité des toxines.

Ces résultats rendront plus facile et plus sûre l'application de la sérothérapie, et permettront d'abaisser encore la mortalité de la diphtérie.

---

## APPAREIL A FILTRATION POUR FAIRE LES ESSAIS DES TOXINES

En étudiant la toxine diphtérique, j'ai dû souvent faire dans un court espace de temps un très grand nombre de filtrations. Il m'était difficile d'employer les appareils en usage dans les laboratoires et j'ai cherché un dispositif plus simple permettant de filtrer très vite de petites quantités de diverses cultures.

Voici la description de l'appareil qui m'a servi : comme l'indique la figure ci-jointe, il se compose essentiellement d'un tube à essai enveloppant une bougie Chamberland; tube et bougie sont placés dans une chambre à vide, tandis que l'intérieur de la bougie est en communication avec le liquide à filtrer.

La partie filtrante de l'appareil est constituée par une bougie Chamberland sans embase dite bougie de laboratoire; cette bougie est vernissée à l'intérieur et à l'extérieur sur une longueur de 5 centimètres à partir de son orifice. Autour de la partie vernissée, on enroule du coton ordinaire et on adapte la bougie à l'extrémité d'un tube à essai de façon qu'elle pénètre à frottement dur.

On peut adapter un certain nombre de bougies à des tubes à essai de capacité variable suivant les besoins; on a ainsi un appareil commode, peu coûteux, facile à stériliser et à conserver stérile.

Il faut avoir soin de ne pas stériliser l'appareil à l'autoclave, car pendant la stérilisation l'eau se condenserait dans les tubes et le liquide après filtration se diluerait dans cette eau condensée; pour éviter cet inconvénient, il faut stériliser le petit appareil dans le four à flamber.

On doit au préalable boucher avec du coton l'orifice de la bougie Chamberland; avec cette précaution, l'intérieur de la bougie et tout l'appareil pourront rester stériles aussi longtemps que les tubes flambés.

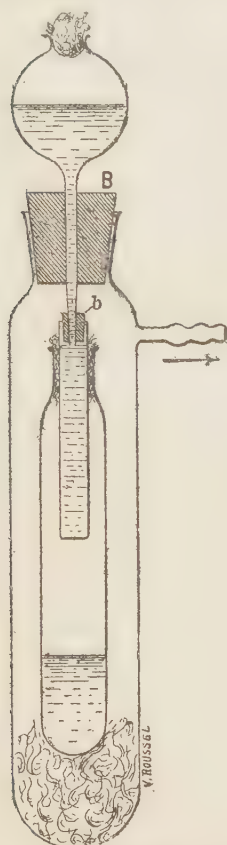
Quand on a stérilisé un certain nombre de bougies réunies à leurs tubes, il est facile de faire autant d'essais qu'on a de tubes et cela très rapidement.

Lorsqu'on veut filtrer, on prend un de ces appareils stérilisés d'avance, on enlève le coton qui ferme l'orifice de la bougie et on met l'intérieur en communication avec un réservoir qui contient le liquide à filtrer.

Ce réservoir est formé par une boule de verre ouverte à l'un de ses pôles et soudée par le pôle opposé à un tube de verre qui s'engage dans l'orifice de la bougie; un bouchon de caoutchouc perforé sert à fixer le tube du réservoir à cet orifice.

Il faut avoir bien soin de faire pénétrer de force le bouchon de caoutchouc dans l'intérieur de la bougie pour que celle-ci soit bien fixée au réservoir. Le réservoir peut servir à plusieurs filtrations, il suffit de prendre la précaution de le passer à l'eau bouillante à chaque changement de bougie.

Lorsqu'on a réuni la bougie à son réservoir, on place tout l'appareil dans un tube de verre; ce tube-manchon est fermé à l'une de ses extrémités, ouvert à l'autre; mais cette ouverture doit être obturée par un bouchon de caoutchouc



perforé en son centre, (ce trou livre passage au tube du réservoir qui va s'engager dans la bougie. Ce gros bouchon B doit se placer entre la boule de verre du réservoir et le petit bouchon *b* qui fixe le tube du réservoir à l'orifice de la bougie.

Le manchon porte en outre une tubulure latérale par où on peut faire le vide dans son intérieur et par conséquent dans l'intérieur du tube à essai, la communication s'établissant au travers du coton qui fixe la bougie au tube à essai.

Il est prudent de garnir avec du coton le culot du tube-manchon; car il peut arriver que le tube à essai quitte sa bougie ou que la bougie quitte le réservoir; cet accident ne se produit pas si la bougie entre à frottement dur dans le tube à essai ou si le petit bouchon est bien fixé à l'orifice du tube, mais avec la précaution que nous indiquons, alors même qu'il se produirait, cet accident resterait sans importance.

Quand la filtration est terminée, on enlève la bougie de l'intérieur du tube à essai, elle est aussitôt remplacée par le tampon de coton d'un gros tube flambé; grâce à cette précaution, on peut conserver le liquide filtré sans le transvaser.

La bougie qui a servi à la filtration doit être placée dans l'eau bouillante ou dans l'autoclave pour être désinfectée.

Les bougies qui servent le plus souvent ont une longueur de 15 centimètres; comme elles sont vernissées sur 5 centimètres, 10 centimètres sont utilisés pour la filtration.

Avec ces bougies on filtre en moins de 5 minutes 50 centimètres cubes de toxine. Si on place dans le réservoir exactement 50 centimètres cubes de culture, on recueille dans le tube à essai 45 à 47 centimètres cubes de liquide.

Si l'on veut employer ce filtre pour essayer de petites quantités de liquides organiques, on voit que pour 10 centimètres cubes de sérum mis dans le réservoir, le filtre laisse passer 7 centimètres cubes, la perte est donc de 3 centimètres cubes.

Dans le cas où on serait obligé de filtrer de très petites quantités de liquide, il suffirait, pour éviter l'absorption par les parois de la bougie, de diminuer sa partie filtrante et de la réduire à 5 ou même à 2 centimètres.

---

# CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE LA FERMENTATION LACTIQUE

PAR HENRI POTTEVIN

---

(Travail fait au Laboratoire de Chimie biologique à l'Institut Pasteur.)

---

## INTRODUCTION

Un grand nombre de microbes produisent de l'acide lactique aux dépens des sucres : mais de même que nous réservons le nom de ferments alcooliques aux êtres qui dédoublent le sucre en alcool et acide carbonique de façon que la somme des deux produits représente à quelques centièmes près le poids du sucre détruit, de même nous appellerons ferments lactiques ceux qui transforment intégralement le sucre en acide lactique à quelques centièmes près. Ces ferments, dont le premier a été décrit par Pasteur, ont été étudiés par Lister, par Richet, par Kayser : leur histoire est trop connue pour qu'il soit nécessaire de la rappeler ici. Les autres êtres qui donnent aussi de l'acide lactique en fournissent des quantités variables dont le poids ne correspond parfois qu'à une très faible partie de celui du sucre consommé.

D'une façon générale on peut dire que les ferments lactiques produisent de l'acide inactif ; les autres microbes des acides actifs.

Nencki avait pensé qu'un même microbe fournissait toujours le même acide et que cette propriété pouvait servir à le caractériser d'une façon certaine ; nous savons aujourd'hui qu'il n'en est rien. M. Péré a montré que telle espèce de *B. coli* qui, cultivée sur glucose, donne de l'acide droit, fournit de l'acide inactif quand elle agit sur la lévulose ; elle est pourtant capable de donner, même avec la lévulose, de l'acide droit, il suffit pour cela qu'on lui rende la vie pénible en remplaçant, dans le milieu de culture, la peptone par un sel ammoniacal ; dans ce cas, le microbe paraît vivre sur le racémate en attaquant de préférence l'acide gauche.

M. Péré a montré qu'il en est réellement ainsi en faisant



agir le *B. coli* sur le lactate de chaux : celui-ci est facilement attaqué, mais tandis que dans les solutions de peptone les deux isomères disparaissent avec une vitesse égale, en sorte que le résidu est toujours de l'acide inactif, dans celles où la peptone est remplacée par un mélange de phosphate et de sulfate d'ammoniaque l'acide droit est détruit le premier, et la différence est d'autant plus accusée que la proportion des sels ammoniacaux présents dans la culture est plus réduite.

Nous sommes donc amené à considérer que les ferments producteurs d'acide lactique commencent tous par donner aux dépens du sucre de l'acide inactif ; les uns, capables de détruire cet acide, brûlent, avec des vitesses variables selon les conditions de la culture, chacun des deux isomères, et aboutissent ainsi à des résidus actifs ; les autres, les ferments lactiques, hors d'état de consommer l'acide lactique, laissent intact celui qu'ils ont une fois formé. Tout ce que nous savons sur les caractères généraux, communs aux microbes qui composent chacune des espèces artificiellement définies ainsi, confirme cette manière de voir. Les ferments lactiquesensemencés dans une solution de peptone additionnée de lactate de chaux restent sans action appréciable sur le sel : ils sont fragiles, perdent facilement leur pouvoir ferment. M. Richet a montré qu'ils étaient très difficiles au point de vue de l'azote alimentaire, ils se refusent à vivre dans les milieux privés de matière albuminoïde en solution. Les autres ferments sont au contraire des agents de combustion énergiques, peu difficiles sur les conditions de la culture, s'accommodant bien des milieux à azote ammoniacal ; il semble que les ferments lactiques dérivent d'eux par atténuation.

Dans les travaux que j'ai eu l'occasion de citer précédemment, M. Péré s'était proposé de rechercher s'il existe des relations de structure moléculaire entre un acide lactique et le sucre dont il dérive. De pareilles relations, si nous en connaissions, en nous montrant quels sont les groupements atomiques de la molécule sucrée qui se retrouvent dans la molécule acide, nous permettraient de fixer sur quel point de la première s'est portée l'action du ferment et à quel acte chimique précis cette action peut être ramenée. Le mécanisme de la fermentation lactique serait éclairci, et ce que j'ai dit de son ubiquité indique quel serait l'intérêt physiologique d'une semblable trouvaille. D'ail-

leurs, à mesure que nous pénétrons plus avant la chimie des cellules vivantes, nous nous apercevons davantage que partout entrent en jeu les mêmes forces soumises aux mêmes lois, et que le bénéfice de toute notion nouvelle s'étend bien au delà du cas particulier à l'occasion duquel elle a été acquise. Dans l'ordre d'idées qui nous occupe, M. Duclaux a introduit dans la science des faits singulièrement suggestifs : nous savons par ses travaux quelle parenté étroite existe entre les phénomènes de décomposition des sucres sous l'influence des ferments et sous l'action de la lumière solaire. Exposé au soleil en solution alcalinisée par l'eau de chaux, le glucose est détruit avec production d'alcool et d'acide carbonique ; si on se sert pour alcaliniser de la solution sucrée d'hydrate de baryte au lieu de chaux, on obtient de l'acide lactique ; dans ces conditions le maltose a donné de l'acide droit, le lévulose de l'acide gauche, le sucre interverti de l'acide inactif par compensation. Nous voyons que le groupement atomique qui dans la molécule de sucre commande par sa position, d'après nos idées actuelles, le sens du pouvoir rotatoire, se conserve dans la molécule d'acide. Malheureusement les faits recueillis jusqu'ici ne semblent pas indiquer qu'il en soit de même dans les fermentations ; M. Péré nous a appris qu'un même sucre lévogyre pouvait donner naissance indistinctement à de l'acide droit ou à de l'acide gauche, suivant que l'azote introduit dans le milieu de culture est à l'état de peptone ou d'ammoniaque. Malgré ces résultats peu encourageants, j'ai pensé que la question valait la peine d'être reprise sur nouveaux frais. Il est à remarquer que toutes les expériences faites jusqu'ici dans cette voie l'ont été avec des ferments produisant peu d'acide lactique ; dans l'exposé que nous venons de faire, nous avons été amené à considérer cet acide comme le résidu d'une double opération, donnant d'abord aux dépens du sucre une forte proportion d'acide, puis détruisant partiellement l'acide ainsi formé ; il ne faut pas trop nous étonner que le résultat de la seconde intervention ne présente pas avec le sucre initial des relations étroites. Si de pareilles relations existent, il semble naturel de les chercher en s'adressant à des ferments lactiques vrais qui nous laissent l'acide tel qu'ils l'ont une fois produit aux dépens du sucre : c'est le but que je me suis proposé dans le présent travail.

## I

## FERMENTATION DES SUCRES

Pour me procurer un ferment lactique, j'ai abandonné l'étuve, sans stérilisation préalable, du jus d'oignons additionné de 10 0/0 de glucose; ce jus se peuple rapidement d'une infinité de microbes parmi lesquels les ferments lactiques dominent; ceux-ci ont été isolés par la méthode des dilutions en liquide.

Le ferment qui fait l'objet de cette étude est un bâtonnet immobile: dans les cultures il se présente isolé ou réuni en chaînettes d'une dizaine d'articles au plus. Il pousse à 35° dans le lait qu'il coagule en 24 heures environ, dans l'eau de touraillons sucrée: son milieu d'élection est le jus d'oignons additionné de 0,5 0/0 de peptone. Il ne pousse que très péniblement sur les mêmes milieux solidifiés par la gélatine ou la gélose.

A la température de 23°, la culture est plus lente qu'à 35°, mais se fait encore; à 40° elle est très pénible, au-dessus il n'y a pas de développement.

Dans l'eau peptonisée à plus de 2 gr. par litre, le ferment se développe bien: il envahit toute la masse du liquide qui devient d'abord légèrement acide, puis à la longue très légèrement alcalin: l'acide volatil qui prend naissance a été étudié par la méthode des distillations fractionnées; c'est de l'acide acétique pur: dans un liquide à 2 0/0 de peptone, il ne s'en trouve jamais plus de 0,2 par litre. L'extraction à l'éther en présence d'un excès d'acide sulfurique ne m'a jamais permis de constater la production d'acide lactique.

*Action sur les sucres.* — Les cultures ont été faites à 35° dans l'eau peptonisée en présence d'un excès de carbonate de chaux.

Pour la recherche des acides fixes, le liquide de culture concentré à consistance de sirop était additionné d'une quantité d'acide sulfurique juste suffisante pour précipiter la chaux et épuisé par l'éther.

Le meilleur procédé pour caractériser et différencier les acides lactiques est l'étude de leurs sels de zinc: ces sels très solubles dans l'eau chaude, peu solubles dans l'eau froide, sont faciles à obtenir purs cristallisés en belles aiguilles.

Le sel de l'acide *inactif* cristallise avec 3 molécules d'eau :  $C^6H^{10}O^6Zn + 3H^2O$ . Les sels actifs cristallisent avec deux molécules seulement :  $C^6H^{10}O^6Zn + 2H^2O$ . — Tous ces sels perdent leur eau de cristallisation par un chauffage de 1 heure à 160°. La perte d'eau correspond à 18,1 0/0 pour le sel inactif, à 12,9 0/0 pour les sels actifs.

Le sel de zinc de l'acide droit dévie à gauche, celui de l'acide gauche dévie à droite.

Le pouvoir rotatoire du lactate lévogyre varie avec la concentration de la solution observée, il diminue quand la concentration augmente; il est de  $-8^{\circ} 5$ , d'après Wislicenus, pour les solutions contenant de 4 à 5 0/0 de sel.

Pour la recherche des acides volatils, j'ai eu recours à la méthode de distillation fractionnée de M. Duclaux.

Lorsque, la nature des acides étant connue, il s'est agi simplement d'en suivre les variations quantitatives au cours d'une fermentation, je me suis contenté de doser la chaux dissoute et les acides volatils; j'ai calculé l'acide lactique par différence.

Pour le dosage de la chaux en solution, le procédé suivant est très rapide et donne des résultats exacts.

50 c.c. du liquide à essayer sont disposés dans un vase de Bohême au-dessus d'un bec Bunsen, additionnés de quelques gouttes d'une solution de phénol-phtaléine et portés à l'ébullition; dans le liquide bouillant, on verse goutte à goutte, en agitant constamment, une solution titrée de carbonate de potasse, il se forme du carbonate de chaux qui se précipite et un sel neutre de potasse qui reste en solution; quand toute la chaux a été précipitée, l'addition d'une nouvelle quantité de  $CO^3K^2$  rend le liquide alcalin. De la quantité de carbonate employée, on déduit la quantité de chaux dissoute. Lorsque la coloration du liquide ne masque pas la couleur rouge de la phtaléine, ce qu'il est toujours facile de réaliser par une dilution convenable, le procédé est très exact.

Je prépare deux solutions, l'une de lactate de chaux pur contenant en 100 c.c. 2 gr. 002 d'acide lactique et l'autre de carbonate de potasse à 3,6 0/0 :

50 c.c. de la sol. de lactate	sont précipités par.	14,1 de la sol. $CO^3K^2$	
25 —	—	+ 25 c.c. eau dist...	7,0 —
10 —	—	+ 40 — ...	2,9 —



*Lactose.* — J'ai employé du lactose obtenu pur par des cristallisations successives dans l'eau, il possédait un pouvoir rotatoire de 55°,4 à 20°.

Des ballons contenant chacun :

Eau.....	200
Peptone.....	2
Lactose.....	8,86
Carbonate de chaux.....	12

sont ensemencés et mis à 35°. Au bout de 24 heures ils sont le siège d'un dégagement actif d'acide carbonique; en prélevant de temps à autre un ballon, on obtient :

Durée de la ferment.	Sucre cons.	Ac. fixe.	Ac. vol.
3 jours	4,66	4,4	0,10
5 jours	6,52	6,2	0,14
12 jours	8,86	8,5	0,16

D'un bout à l'autre de la fermentation, l'acide volatil a été de l'acide formique.

Le contenu de trois ballons pris au 12<sup>e</sup> jour a été mélangé : l'acide fixe extrait à l'éther. On a obtenu :

Sucre consommé.....	26,58
Acide fixe.....	26,0
Acide volatil (ac. form.).....	0,5

L'acide après l'évaporation de l'éther a été transformé en sel de zinc celui-ci purifié par 2 cristallisations a donné :

Perte d'eau à 160° 0/0 de sel.....	18,3
ZnO 0/0 de sel anhydre.....	33,1
Rotation.....	Inactif.

L'acide est de l'acide *inactif*.

Il est à remarquer que l'acide volatil de la culture, qui était de l'acide acétique lorsque le ferment se développait dans la peptone seule, devient de l'acide formique lorsqu'il est produit aux dépens du sucre<sup>1</sup> :

L'acide lactique obtenu représente 97,7 0/0 du sucre détruit; il est bien produit uniquement aux dépens du sucre et non de la

1. Dans toutes les expériences rapportées ultérieurement, l'acide volatil sera, sauf indication contraire, exprimé en acide formique.

peptone ou des impuretés que celle-ci peut apporter avec elle, car l'augmentation de la teneur en peptone n'augmente pas la quantité d'acide fixe, tandis que l'addition d'un certain poids de sucre détermine la formation d'un poids exactement correspondant d'acide lactique.

Trois ballons ont reçu chacun 200 c. c. d'une solution de lactose à 5,01 0/0, du carbonate de chaux, et en outre

Le ballon	I.....	2 grammes de peptone.		
—	II.....	4	—	—
—	III.....	10	—	—

Après 15 jours de séjour à l'étuve, les ballons ont été repris. Le sucre avait disparu de tous. Les quantités d'acide formé étaient :

	Ac. fixe.	Ac. vol.
	—	—
I.....	9,8	0,18
II ..	9,5	0,20
III.....	9,5	0,25

L'acide volatil est de l'acide formique dans les trois ballons.

Trois ballons ont reçu chacun du carbonate de chaux, 200 c. c. d'une solution contenant 1 0/0 de peptone et en plus :

Dans le ballon	I.....	7,6 de lactose.	
—	II.....	3,8	—
—	III.....	4,6	—

Les ballonsensemencés et mis à l'étuve ont donné au bout de 15 jours, le sucre ayant entièrement disparu de tous :

	Ac. fixe.	Ac. vol.
	—	—
I.....	7,4	0,14
II.....	3,6	0,11
III.....	4,5	0,09

Si, au lieu de diminuer la proportion de sucre comme dans l'expérience précédente, on diminue la proportion de peptone, la culture devient traînante, la proportion d'acide volatil produit augmente, et la nature de l'acide lactique est modifiée.

Trois ballons ont reçu chacun 100 c.c. d'une solution de lactose contenant 5,12 de sucre, du carbonate de chaux et les quantités de peptone suivantes :

Ballon	I.....	1,0
—	II.....	0,5
—	III.....	0,2

Après deux mois de séjour à l'étuve, ils ont donné :

	Sucre restant.	Ac. fixe	Ac. vol.	Ac. vol. 0/0 d'ac. fixe.
I.....	0	5,0	0,1	2,0
II.....	0	4,2	0,45	10,7
III.....	4,2	0,5	0,07	14,0

L'acide du ballon I est de l'acide *inactif*.

Le sel de zinc obtenu avec l'acide du ballon II a donné :

Perte d'eau à 160°.....	16,7
ZnO 0/0 de sel anhydre.....	33,1

1 gramme de sel dissous dans l'eau de façon à faire 25 c. c. a donné une rotation gauche de — 10° au tube de 20 centimètres.

Le sel est un mélange de *lactate inactif* et de *sarcolactate*.

Ainsi donc, en diminuant la proportion de peptone, nous déterminons la production d'un acide actif, sans que le ferment perde pour cela ses qualités de ferment lactique vrai, puisque l'acide obtenu représente 82 0/0 du sucre détruit.

Pour bien mettre ces faits en évidence, il y aurait lieu de reprendre l'expérience avec des doses comprises entre celle du ballon II et celle du ballon III ; je ne l'ai pas fait parce que j'ai retrouvé, en étudiant les autres sucres, toujours le même phénomène très nettement.

*Saccharose.* — Le saccharose mis à fermenter en présence de 1 0/0 de peptone se comporte comme le lactose.

10,1 grammes ont donné après 15 jours :

Sucre détruit.....	10,1
Acide lactique.....	9,8
Acide vol.....	0,12

L'acide est *inactif*.

Un essai de fermentation en présence de 5 0/0 de saccharose et de 0,8 0/0 de peptone, ne m'a pas donné d'acide lactique en quantité appréciable.

*Maltose.* — J'ai employé du maltose industriel purifié par des cristallisations dans l'alcool.

Son pouvoir rotatoire était  $\alpha_D = +140,0$ .

Quatre ballons ont reçu chacun 200 c. c. d'une solution sucrée contenant 11<sup>gr</sup>,40 de maltose, du carbonate de chaux et en outre :

Ballon I.....	2 gr. de peptone.
— II.....	1 —
— III.....	0,8 —
— IV.....	0,6 —

Dans les ballons I et II la fermentation, très rapide au début, a paru terminée vers le dixième jour. Les 4 ballons repris au bout de 1 mois ont donné :

	Sucre cons.	Ac. fixe	Ac. vol.
I.....	41,4	10,8	0,14
II.....	41,4	10,6	0,16
III.....	9,6	9,2	»
IV.....	3,4	3,0	0,41

Le contenu des deux ballons I et II mélangé a donné de l'acide *inactif*.  
Le ballon IV a fourni un sel de Zn donnant :

Perte d'eau à 160.....	12,8
ZnO 0/0 de sel anhydre.....	32,9
0,936 dissous en 23 c. c. d'eau. Rot. 20 c. c. —	0°,63
Pouvoir rot. $\alpha_D$ .....	— 8°,5

L'acide est de l'acide *droit*.

Nous voyons très nettement, dans le cas présent, que le ferment qui donne en présence d'une certaine dose de peptone de l'acide inactif, donne avec une dose à peine plus faible de l'acide droit : nous devons remarquer aussi que le poids d'acide obtenu représente 88 0/0 du poids du sucre consommé : il ne saurait être question ici de la formation d'un racémate dédoublé par une action ultérieure du ferment. Le corps actif est formé directement aux dépens du maltose.

Nous allons retrouver le même fait d'une façon constante en étudiant les sucres à six atomes de carbone.

*Glucose*. — J'ai employé un glucose pur du commerce.

10<sup>gr</sup>, 0 de glucose ont donné au bout de 1 mois :

	Gluc. cons.	Ac. lact.	Ac. vol.	Rot sel. Zn
En prés. 1 0/0 pept.	40,0	9,7	0,13	Inactif.
0,5	40,0	9,8	0,15	Inactif.
0,4	7,5	7,1	.	.
0,3	2,9	2,4	0,1	— 8°,8

*Sucre interverti*. — 11<sup>gr</sup>,2 de sucre interverti ont donné après 14 jours, en présence de 1 0/0 de peptone :

Acide lactique.....	10,8
Acide volatil.....	0,18

L'acide est *inactif*.

*Galactose*. — J'ai employé un galactose pur du commerce. Le pouvoir rotatoire évalué en mesurant la rotation sur une solu-



tion à 5 0/0, le sucre étant dosé par réduction, est de 82°,4 à 17°. 9<sup>gr</sup>,2 de galactose ont donné au bout de cinq semaines :

	Suc. cons.	Ac. lact.	Ac. vol.	Rot. sel. zinc.
	—	—	—	—
En prés. 1 0/0 pept.	9,2	8,9	0,14	Inactif.
0,5	6,9	6,7	0,14	
0,4	4,9	4,6	0,12	— 8°,9

*Mannose.* — 100 grammes de poudre de corozo délayés dans 500 c. c. d'eau additionnée de 16 c. c. d'acide sulfurique à 66° B, ont été maintenus à l'autoclave à 120° pendant 1 heure; la masse étant refroidie et le liquide filtré, j'ai fait subir au résidu deux fois encore le même traitement, l'ensemble des liquides acides saturé par le carbonate de chaux, décoloré par le noir animal, est limpide, à peu près incolore, il contient une quantité de sucre qui, évaluée comme mannose, représente 46<sup>gr</sup>,5, avec un pouvoir rotatoire de + 12°,8. Le sucre est donc du mannose pur.

8<sup>gr</sup>,96 de mannose ont donné au bout de un mois :

	Suc. cons.	Ac. lact.	Ac. vol.	R. sel. Zn
	—	—	—	—
En prés. 1 0/0 pept.	8,96	8,5	0,21	Inactif.
0,5	4,4	4,06	0,12	— 9°

Ainsi lorsque, l'aliment azoté étant abondant, la culture est facile, le ferment donne avec tous les sucres étudiés indistinctement de l'acide inactif; si l'azote devient rare, la culture est pénible et nous aboutissons dans tous les cas à de l'acide droit. Il apparaît bien clairement que ce n'est pas de la constitution stéréochimique du sucre que dépend la nature de l'acide, mais bien des conditions de vie qui sont faites au ferment: pour compléter cette notion, il y avait lieu d'examiner si, quand on gêne la culture de différentes façons, en changeant la nature de l'azote alimentaire, en élevant la température, en ajoutant des antiseptiques, on obtiendrait des résultats analogues à ceux que donne la diminution de la dose de peptone. J'ai vainement essayé de substituer à la peptone les sels ammoniacaux, tartrate, succinate, nitrate ou l'asparagine, le ferment n'a pas poussé.

J'ai dit que la température optima pour le ferment était vers 35°; à 40° le développement se fait encore, mais très péniblement; dans ces conditions, 12<sup>gr</sup>,5 de lactose dissous dans l'eau peptonisée à 1 0/0 ont donné après six semaines :

Sucre consommé.....	6,6
Acide lactique.....	5,6
Acide volatil.....	0,4

Le sel de zinc de l'acide a donné :

Perte d'eau à 160°.....	13,4
Zn O 0/0 de sel anhydre.....	33,1
1,236 diss. en 25 c. c. eau. Rot. 225.....	— 0°,4

L'acide obtenu est un mélange de droit et d'inactif.

Un certain nombre de ballons contenant du carbonate de chaux et 200 c. c. d'une solution à 1 0/0 de peptone et 4<sup>gr</sup>,02 0/0 de lactose, ont reçu des doses croissantes d'acide phénique, ils ont étéensemencés et mis à 35° : au bout de un mois et demi, ils ont donné :

	Suc. cons.	Ac. lact.	R. sel. Zn.
En prés. de 2 gr. p. lit. de phén.	0	0	—
1 —	5,95	5,1	— 8°,4.
0 —	8,04	7,87	Inactif.

## II

### FERMENTATION DES ALCOOLS POLYATOMIQUES

Les sucres sont pour notre ferment des aliments de digestion facile ; si les conditions de la culture sont bonnes par ailleurs, ils sont rapidement consommés ; il n'en est pas de même des alcools polyatomiques : ceux du moins que j'ai étudiés, la mannite, la glycérine, la dulcite sont d'une digestion extrêmement pénible. Dans l'eau peptonisée à 1 0/0, le ferment se développe bien, envahissant la totalité du liquide qui devient uniformément trouble. Dans le même milieu additionné de 5 0/0 de mannite, la culture se fait lentement ; elle est en grumeaux qui restent déposés au fond du ballon : si on les agite, ils se répandent dans le liquide sans produire de trouble véritable. Dans les solutions peptonisées à 1 0/0, la destruction des alcools polyatomiques est lente, elle ne donne jamais lieu à un dégagement visible d'acide carbonique. On ne gagne rien à augmenter la dose de peptone qui a pu être portée à 2 0/0 et 5 0/0 sans que l'action devienne

plus rapide. La proportion d'acide volatil obtenu est ici bien plus considérable qu'avec les sucres, et il se forme en outre une quantité notable d'alcool éthylique.

*Mannite.* — Des ballons contenant chacun 5 grammes de mannite dissous dans 100 c. c. d'eau peptonisée à 1 0/0 ont donné :

	Act. lact.	Ac. vol.	Alcool
	—	—	—
Après 12 jours.....	1,45	0,2	0,6
Après 4 mois.....	2, 0	0,3	0,8
Après 3 mois.....	4, 5	0,6	0,4

L'acide obtenu était toujours de l'acide droit.

On obtient une destruction un peu plus rapide de la mannite en remplaçant l'eau peptonisée par le jus d'oignons additionné de 0,5 0/0 de peptone. 100 grammes de mannite, mis à fermenter dans ces conditions, ont donné après deux mois et demi :

Alcool éthylique.....	9,7
Acide acétique.....	5,0
Acide formique.....	4,9
Acide lactique.....	62,4

L'acide était de l'acide droit.

*Dulcite.* — 30 grammes de dulcite mis à fermenter à 35°, dans 600 c. c. d'eau peptonisée à 1 0/0, ont donné au bout de 1 mois :

Alcool éthylique.....	2,4
Acide formique.....	1,74
Acide lactique.....	7,83

Acide droit.

*Glycérine.* — 25 grammes de glycérine ont été mis en fermentation dans 500 c. c. d'eau peptonisée à 1 0/0 : le ballon a été repris au bout de deux mois ; dans 50 c. c. de liquide, j'ai dosé la glycérine non attaquée ; dans le reste j'ai dosé les acides ; j'ai trouvé :

Glycérine consommée.....	5,6
Acide lactique.....	3,2
Acide formique.....	0,8

Acide droit.

## III

## ACTION SUR QUELQUES ACIDES ORGANIQUES

Le ferment que nous venons d'étudier est sans action sur le lactate de chaux. Des cultures en eau peptonisée à 5 0/0 de lactose, abandonnées à l'étude pendant plus d'un an, ont donné à l'analyse la même quantité d'acide fixe que les cultures semblables analysées 15 jours après l'ensemencement. Deux essais faits, l'un dans du jus d'oignon additionné de 1/2 0/0 de peptone et de 5 0/0 de lactate de chaux pur, l'autre dans une solution de lactate de chaux pur à 2 0/0 additionnée de peptone aux doses de 1 : 0,5 : 0,3 0, 0, laissés trois mois à l'étude, ne m'ont permis de constater aucune attaque du lactate de chaux ; pourtant, dans tous ces liquides, le ferment s'était développé.

Je n'ai pu constater l'attaque ni du succinate de chaux, ni des tartrates de chaux de magnésic ou d'ammoniaque : par contre, le malate de chaux est attaqué avec facilité.

Ensemencé dans une solution de peptone à 2 0/0 additionnée de 5 0/0 de malate neutre de chaux, le ferment se développe rapidement et, au bout de quelques jours, le liquide est le siège d'un dégagement gazeux très actif.

100 grammes de malate de chaux, correspondant à 64<sup>gr</sup>,4 d'acide malique, ont donné après 1 mois de culture, le dégagement gazeux étant arrêté depuis plusieurs jours déjà :

Alcool éthylique .....	5,28
Acide acétique.....	10,3
Acide formique .....	16,2
Acide carbonique restant à l'état de carbonate de chaux.....	8,61

Tout l'acide malique a disparu, et il ne reste dans la culture ni acide lactique, ni aucun autre acide fixe, car la chaux en solution correspond à celle qui sature les acides acétique et formique, et d'autre part le résidu insoluble qui reste au fond du ballon dissous dans l'acide acétique donne de l'acétate de chaux sans mélange.



## CONCLUSIONS

Il résulte de l'étude que nous venons de faire :

1° Qu'un ferment lactique peut, tout en conservant ses qualités de ferment lactique vrai, donner naissance à l'acide actif, celui-ci représentant plus de 80 0/0 du sucre détruit;

2° Que la nature de l'acide n'est sous la dépendance directe ni de la fonction chimique, ni de la constitution de l'hydrate de carbone dont il dérive ; elle dépend d'un ensemble complexe de facteurs. J'ai montré qu'un certain nombre d'influences qui aboutissent à un ralentissement de la culture, la diminution de l'azote alimentaire, une température élevée, l'addition d'antiseptiques, la résistance plus grande de l'aliment hydrocarboné déterminaient toutes la production du même acide droit ; peut-être en est-il d'autres qui nous conduiraient à l'acide gauche. Dans des questions aussi complexes, il faut accumuler patiemment les faits et avant tout se garder des généralisations hâtives.

---

# FERMENTATION LACTIQUE DES CORPS SUCRÉS

PAR LE COLI-BACILLE DU NOURRISSON

PAR M. A. PÉRÉ

Pharmacien-major de 1<sup>re</sup> classe.

---

Travail du laboratoire de Chimie biologique, à l'Institut Pasteur.

---

L'étude biologique des microorganismes a depuis longtemps révélé l'existence de types de transition entre des êtres nettement séparés par leurs caractères : c'est ainsi que les *mucors*, les *mycolevures* sont venus prendre leur place naturelle entre les mucédinées et les levures <sup>1</sup>. Cette notion ne s'est que lentement fait jour, parce qu'elle heurtait certaines habitudes d'esprit et paraissait hostile à tout essai de classification morphologique. Il a fallu pourtant l'accepter, et même, quand on a appliqué les méthodes qui l'avaient fournie à l'étude des groupes qui, à un premier examen, avaient paru constituer une espèce bien déterminée, on s'est souvent aperçu que cette espèce sortait un peu ou même totalement disloquée de cette étude plus approfondie de ses caractères biologiques.

Par ce côté, rien n'est plus édifiant que l'étude du *Bacterium coli commune*. Tant que l'on se borna, pour déterminer ce microbe, à l'observation de ses caractères morphologiques et de l'aspect de ses cultures sur les divers milieux, on put le considérer comme formant une espèce déterminée, et même soutenir l'hypothèse de son identité avec le bacille typhique ; mais la discussion s'éteignit dès que l'on s'avisa de recourir aux caractères biologiques : il fallut alors reconnaître, non seulement que ces deux microbes ne sont pas identiques, mais encore que le *B. coli* ne constitue pas un type unique, que ses propriétés varient suivant son origine, comme s'il était en continuelle évolution.

1. DUCLAUX. *Chimie biologique*.

Pour n'envisager qu'un seul des attributs du *B. coli*, celui de faire de l'acide lactique droit en partant du glucose, à l'inverse du bacille typhique qui fait de l'acide lactique *gauche*, Van Ermengen a reconnu que parmi plusieurs échantillons soumis à son étude, les uns faisaient de l'acide lactique *droit*, les autres de l'acide lactique *gauche*. J'ai déjà cherché à m'expliquer ces divergences <sup>1</sup> : j'ai reconnu que le coli-bacille de l'homme, lorsqu'il provient de l'intestin de l'adulte, fait toujours de l'acide lactique gauche avec le glucose ; mais qu'il fait, lorsqu'il provient de l'intestin du nourrisson, ou de l'acide lactique droit ou de l'acide lactique gauche, suivant la nature de l'azote alimentaire.

D'autres contradictions subsistent : plusieurs observateurs accordent au *B. coli* la propriété, que d'autres lui refusent, de faire fermenter certains corps sucrés, tels que le saccharose, la glycérine. Comme je le montrerai, ces contradictions ne sont qu'apparentes.

Mais en entreprenant ces nouvelles recherches, j'avais surtout en vue de réunir quelques faits sur une question que je m'étais déjà posée <sup>2</sup>, et qui me semble encore d'actualité, bien que M. Kayser <sup>3</sup> et M. Pottevin <sup>4</sup> l'aient enrichie de documents d'un haut intérêt, à savoir quelles relations peuvent exister entre la structure moléculaire de l'acide lactique produit par un ferment donné et la structure moléculaire du sucre générateur, ou la quantité et la qualité de l'azote alimentaire, ou les conditions générales de la fermentation. Les faits consignés dans cette note ne me semblent pas faire tous double emploi avec ceux qui nous sont déjà connus. J'appellerai plus particulièrement l'attention sur le suivant : c'est qu'un même ferment peut, en partant d'un même sucre, laisser de l'acide lactique inactif, ou de l'acide droit, ou de l'acide gauche, ou un mélange non compensé des deux stéréo-isomères.

1. Société de biologie, mai 1896.

2. Ces *Annales*, t. VII, Formation des acides lactiques isomériques.

3. Ces *Annales*, t. VIII, Contribution à la fermentation lactique.

4. Contribution à l'étude de la fermentation lactique, ce volume p. 49.

## I

Dans une première série d'expériences, j'ai mis en œuvre les divers sucres et alcools polyatomiques dans des conditions de culture absolument identiques.

Voici la composition de ces liquides de culture :

## LIQUIDE A :

Sucre ou alcool polyatomique....	40 grammes.	} pour 200 c. c.
Peptone.....	3 —	
Carbonate de chaux.....	6 —	

Après stérilisation, ces liquides recevaient la valeur d'une anse de platine d'une culture sur bouillon âgée de 6 jours. La semence provenait des selles d'un nourrisson âgé d'un mois. La température d'incubation était de 38°.

J'ai exprimé les résultats par le poids du lactate de zinc obtenu, sa teneur en eau de cristallisation, et son action sur la lumière polarisée.

*Dextrose.* — Durée de la fermentation : 4 à 5 jours.

P. du lactate de zinc purifié.....	4,757 gr.
$\alpha = -40'$ . $[\alpha]_D$ .....	3°47'

Après 24 heures, la solution a laissé déposer 0,2144 de sel cristallisé qui a donné :

Perte d'eau à 160°, 0/0.....	16,04
ZnO, 0/0 du sel anhydre.....	33,20

Le sel obtenu par l'évaporation du liquide filtré a donné :

Perte d'eau à 160°, 0/0.....	14,16
ZnO, 0/0 du sel anhydre.....	33,14

1. Dans toutes ces expériences, la solution du sel de zinc total était ramenée à 20 c. c; l'observation au polarimètre se faisait à la température de 20° et au tube de 2 décimètres. — Je rappellerai que les lactates actifs de zinc renferment 12,90 0/0 d'eau et le lactate inactif 18,18 0/0.



Nous retrouvons donc un mélange d'acide lactique *inactif* et d'acide lactique *droit*, soit que l'acide droit et l'acide gauche prennent naissance concurremment et en proportions inégales, soit plutôt que la formation primitive d'acide inactif s'accompagne, dans le protoplasma cellulaire, du dédoublement de cet acide par l'attaque plus prononcée du côté gauche de sa molécule racémique.

*Mannose.* — Durée de la fermentation : 10 jours.

P. du sel de zinc purifié.....	1,738 gr.
Perte d'eau à 160°, 0/0.....	18,06
ZnO, 0/0 du sel anhydre.....	33,26

Acide lactique *inactif*.

*Galactose.* — Durée de la fermentation : 10 jours.

P. du sel de zinc purifié.....	1,015 gr.
Perte d'eau à 160°, 0/0.....	18,10

Acide lactique *inactif*.

*Sucre interverti.* — Durée de la fermentation : 9 à 10 jours.

P. du sel de zinc purifié.....	1,615 gr.
Perte d'eau à 160°, 0/0.....	18,04

Acide lactique *inactif*.

Ces trois fermentations aboutissent à l'acide inactif, soit que la quantité d'acide lactique retrouvée représente la quantité totale de l'acide lactique formé dans le protoplasma, soit que l'acide lactique, primitivement formé, subisse une attaque parallèle et d'égale intensité par les deux côtés de sa molécule racémique.

*Arabinose.* — Durée de la fermentation : 13 jours.

Solution du sel de zinc  $\alpha = \dots\dots\dots + 14'$

Nous voyons apparaître ici l'acide lactique *gauche* en petite quantité.

*Saccharose.* — Durée de la fermentation : 6 jours.

P. du sel de zinc purifié.....	1,950 gr.
$\alpha = - 4^{\circ} 6'$ . $[\alpha]_D = \dots\dots\dots$	$- 5^{\circ} 38'$
Perte d'eau à 160°, 0/0.....	13,62
ZnO, 0/0 du sel anhydre.....	33,20

Acide lactique *droit*.

Il ne se dépose pas spontanément de cristaux, comme dans le cas du dextrose. Néanmoins la proportion d'eau un peu élevée permet d'assurer que l'acide droit est mêlé d'une faible proportion d'acide gauche.

*Lactose*. — Durée de la fermentation : 11 à 12 jours.

P. du sel de zinc purifié.....	0,460 gr.
$\alpha = + 24'$ . $[\alpha]_D =$ .....	+ 8°41'

Acide lactique *gauche*.

*Mannite*. — Durée de la fermentation : 12 jours,

P. du sel de zinc purifié .....	0,652 gr.
$\alpha = + 32'$ . $[\alpha]_D =$ .....	+ 8°40'
Perte d'eau à 160°, 0/0.....	12,9½
ZnO, 0/0 du sel anhydre.....	32,90

Acide lactique *gauche*.

*Dulcite*. — Durée de la fermentation : 16 jours.

Solution du sel de zinc :  $\alpha =$  ..... + 14'

Acide lactique *gauche*.

*Glycérine*. — Durée de la fermentation : 15 jours.

Solution du sel de zinc :  $\alpha =$  ..... + 22'

Acide lactique *gauche*.

Ainsi, parmi tous ces corps sucrés, les uns produisent de l'acide inactif (mannose, galactose, sucre interverti); d'autres de l'acide droit (dextrose, saccharose); les autres de l'acide gauche (arabinose, lactose, alcools polyatomiques): et cela, par l'action d'un même ferment et dans des conditions de culture identiques pour tous, puisque les liquides mis en fermentation ne différaient entre eux que par la nature du corps ternaire. Il est bien vraisemblable, vu la petite proportion d'acide lactique retrouvée et les formes stéréo-isomériques différentes qu'il affecte, sans qu'il nous soit possible de relier ces formes à la structure moléculaire du corps générateur, que les acides actifs ne dérivent point directement des divers sucres, mais procèdent d'une fermentation

secondaire qui atteindrait l'acide inactif primitivement formé : hypothèse raffermie par le fait que ce microbe, comme je l'ai montré ailleurs, peut attaquer et dédoubler le lactate de chaux.

Les résultats ci-dessus permettent un curieux rapprochement entre la structure de l'acide lactique formé et la résistance que le sucre générateur oppose à l'action dislocatrice du ferment : les sucres dont la destruction est très rapide nous donnent de l'acide droit ; ceux qui fermentent moins vite nous donnent de l'acide inactif ; enfin l'acide gauche provient de ceux qui résistent le mieux à l'action du ferment. Il est dès lors bien évident que la structure de l'acide lactique engendré est liée à des raisons de l'ordre purement physiologique, en particulier à la valeur alimentaire des divers corps sucrés, et non d'une manière directe à la structure stéréo-chimique de ces sucres.

Il est aussi à noter que les proportions d'acide gauche sont minimales, dans les fermentations lentes où il se produit, en regard des proportions d'acide inactif ou d'acide droit, dans les fermentations plus rapides qui leur donnent naissance. Il semblerait que le microbe, effectuant difficilement l'attaque de l'aliment ternaire qu'on lui a offert, poursuit d'autant plus énergiquement l'attaque de l'acide lactique formé dans la réaction initiale ; le choix entre les deux aliments, sucre ou alcool et acide lactique, se trouvant moins marqué dans les fermentations lentes que dans les fermentations rapides.

En outre des différences de quantité, ce coli-bacille présente, avec le ferment lactique de M. Pottevin, des différences de qualité extrêmement intéressantes : à l'inverse du premier, celui-ci donne de l'acide droit avec les sucres dont l'attaque lui est difficile ; avec les divers sucres, il ne donne que deux acides lactiques, le droit et l'inactif, alors que le coli-bacille peut aboutir aux trois acides stéréo-isomériques.

Je ferai remarquer, en dernier lieu, que le coli-bacille du nourrisson attaque le saccharose, la dulcité et la glycérine, ce que ne peut faire le coli-bacille de l'adulte : c'est peut-être à la différence dans l'origine des germes étudiés qu'il faudrait attribuer les divergences dans les résultats obtenus par divers observateurs, dans leur étude du *Bact. coli commune*.

## II

A la suite de ces données se présente naturellement à l'esprit cette hypothèse que tout sucre, saccharose, dextrose, mannose, qui donne de l'acide lactique droit ou de l'acide inactif dans les conditions de fermentation indiquées ci-dessus, que j'appellerai *normales*, pourra nous conduire à l'acide lactique gauche, si, par quelque artifice de culture, nous rendons son attaque plus difficile, et sa fermentation plus lente. J'ai donc fait quelques expériences sur ces trois sucres, en modifiant les conditions de la fermentation, soit par l'addition d'antiseptiques, soit par l'abaissement de la température, soit par une diminution de l'azote alimentaire ou par la substitution de l'azote minéral à l'azote organique.

*Saccharose.* — 1. Le liquide A est additionné de 1 pour 1000 de phénol :

P du lactate de zinc purifié.....	1,506 gr.
$\alpha = - 56'$ . $[\alpha]_D$ .....	— 6°, 44'

*Acide lactique droit.*

Rien n'est donc changé dans les résultats; mais il faut dire que si la fermentation débute plus tard que la fermentation *normale*, elle se poursuit, une fois mise en train, avec une grande régularité et la même vitesse. Il est possible qu'il se fasse parmi les germes une véritable sélection, les moins vigoureux ne pouvant s'adapter à ces conditions d'existence.

2. Le liquide A est maintenu à 25°.

Solution du sel de zinc.....	$\alpha = - 36'$
------------------------------	------------------

*Acide lactique droit* <sup>1</sup>.

3. La proportion de peptone est réduite à 10 0 0 de ce qu'elle était dans le liquide A.

La fermentation s'arrête avant que le sucre soit complètement détruit.

1. Je dois signaler ici la formation d'acide succinique en proportion notable alors que la fermentation normale du sucre de canne n'en fournit pas; mais la fermentation du lactose et des alcools polyatomiques en donnait de petites quantités.



Solution du sel de zinc.....  $\alpha = - 22'$

Acide lactique *droit*.

4. Sels ammoniacaux, en place de peptone. Le sucre n'est pas attaqué.

Nous obtenons donc toujours de l'acide lactique droit, comme dans les conditions normales de culture : le saccharose s'est montré rebelle à toute influence modificatrice.

Nous allons voir qu'il n'en est pas de même avec le dextrose, bien que ce sucre se comporte comme le saccharose dans les conditions normales de culture.

*Dextrose*. — 1. Température : 25°. Liquide A.

P. du sel de zinc purifié.....	4,5624 gr.
$\alpha = + 34'$ . $[\alpha]_D$ .....	+ 30,37'
Eau de cristallisation, 0/0.....	15,76
ZnO, 0/0 du sel anhydre.....	33,4

Nous sommes en présence d'un mélange des acides stéréoisomères, mais ici la proportion d'acide gauche l'emporte, contrairement à ce qui s'est produit dans la fermentation normale.

2. La proportion de peptone est réduite à 10 0/0 de ce qu'elle était dans le liquide A.

Solution du sel de zinc.....  $\alpha = + 20'$

Acide lactique *gauche*.

La fermentation s'est arrêtée alors que le liquide renfermait encore de notables proportions du sucre.

3. Sels ammoniacaux, en place de peptone <sup>4</sup>.

P. du sel de zinc purifié.....	0,5964 gr.
$\alpha = + 26'$ . $[\alpha]_D$ .....	+ 70,20'
Eau de cristallisation 0/0.....	12,82

Acide lactique *gauche*.

Toutes les influences modificatrices mises en jeu nous ont conduit à l'acide lactique *gauche*. Voyons à présent ce que nous donne la mannose.

4. Sulfate d'ammoniaque.....	2 grammes	} pour 200 <sup>cc</sup> de liquide.
Phosphate d'ammoniaque.....	2 —	
Carbonate de chaux.....	Q. S.	

*Mannose.* — 1. La composition du liquide de culture ne diffère de celle du liquide A que par l'addition de 5/10000 de phénol.

P. du sel de zinc purifié.....	4,4756 gr.
$\alpha = - 42'$ . $[\alpha]_D$ .....	— 6°, 7'
Eau de cristallisation, 0/0.....	43,42

Acide lactique *droit*.

2. Température : 25°. Liquide A.

P. du sel de zinc purifié.....	1,9246 gr.
$\alpha = - 4^{\circ} 4'$ . $[\alpha]_D$ .....	— 5°, 32'
Eau de cristallisation, 0/0.....	43,50

Acide lactique *droit* mêlé de traces d'acide gauche.

3. La proportion de peptone est réduite à 10/0.

La solution de lactate laisse déposer spontanément des cristaux renfermant 47,08/0 d'eau.

Solution de lactate de zinc filtrée.....	$\alpha = - 8'$
--	-----------------

Léger excès d'acide lactique *droit*.

4. Sels ammoniacaux, en place de peptone.

P. du sel de zinc purifié.....	0,762
$\alpha = + 32'$ . $[\alpha]_D$ .....	+ 7°
Eau de cristallisation 0/0.....	12,76

Acide lactique *gauche*.

Il est très intéressant de remarquer que les trois sucres mis à l'épreuve ne reconnaissent pas de la même manière les diverses influences que j'ai fait agir : tandis que le saccharose s'est montré indifférent à ces influences, à ne considérer, bien entendu, que la structure de l'acide lactique engendré, la dextrose leur obéit toujours dans le même sens, faisant de l'acide gauche sitôt que nous modifions les conditions de la fermentation. Quant au mannose, il réagit diversement sous les influences diverses, faisant tantôt de l'acide droit, tantôt de l'acide gauche, alors qu'il donne de l'acide inactif dans la fermentation normale.

Rien ne saurait montrer avec plus de netteté l'absence de toute relation directe entre la structure du sucre générateur et celle de l'acide lactique formé, ni mettre plus clairement en évidence

les relations étroites qui existent entre la structure de l'acide lactique produit et les conditions générales de la fermentation.

Comme on le voit, le ferment de M. Pottévin, qui donne deux acides lactiques (droit et inactif) avec les divers corps sucrés, suivant la nature du sucre mis en fermentation, peut aussi donner les deux mêmes acides lactiques avec un même sucre; de même notre coli-bacille, qui fait les 3 acides lactiques stéréo-isomériques avec les divers corps sucrés, peut faire aussi ces trois acides lactiques avec un même sucre.

---

# REVUES ET ANALYSES

---

## RAPPORT

PRÉSENTÉ AU NOM DE LA SOUS-COMMISSION DE L'HYGIÈNE  
À LA COMMISSION EXTRA PARLEMENTAIRE  
du Monopole de l'Alcool.

PAR M. DUCLAUX, <sup>1</sup>

---

MESSIEURS,

Votre Sous-Commission de l'hygiène s'est uniquement préoccupée, dans ses premières séances, de ce qu'on pourrait appeler le côté physiologique du problème de l'alcoolisme. Tous les projets de monopole ou de rectification publiés jusqu'ici visent avant tout une réforme hygiénique: c'est la valeur morale et sociale qu'on leur supposait sous ce rapport, bien plus que leur incertaine valeur fiscale, qui leur a fait rapidement tant et de si chauds partisans. Il a paru à votre Sous-Commission qu'elle se devait et qu'elle vous devait d'attirer l'attention du public sur le degré de solidité de ces espérances hygiéniques, de dresser le bilan de ce qu'on pouvait attendre, dans cette voie, des mesures proposées, d'indiquer les barrières naturelles devant lesquelles toute action législative devient impuissante, bref, d'établir les princi-

1. A la suite de la présentation de divers projets de monopole de l'alcool, une commission extra parlementaire a été nommée pour l'étude des questions scientifiques et industrielles que soulevaient ces projets. Après avoir tenu quelques séances, cette commission a nommé deux sous-commissions, l'une dite de *Hygiène*, l'autre dite des voies et moyens. La première a clôturé provisoirement ses travaux par l'adoption du rapport que voici.

En publiant ce rapport, qui date du mois d'avril dernier, je crois devoir faire observer qu'il représente les idées de la Sous-Commission, présidée par M. Ribot, qui l'a accepté à l'unanimité. Mais il ne va pas jusqu'au bout des miennes. On y retrouvera pourtant quelques-unes de celles que je soutiens depuis longtemps dans ces *Annales*, et qui sont revêtues aujourd'hui de toute l'autorité de la Sous-Commission.



pes dont les pouvoirs publics ne peuvent faire autrement que de s'inspirer, sous peine d'échouer dans leur œuvre.

Tout d'abord une question préliminaire s'est posée devant elle. Avait-elle le droit, au nom des principes, de proscrire l'alcool sous toutes ses formes, même sous celle de vin, de bière, de cidre? Il lui a paru que cet ostracisme absolu n'était pas autorisé. Le vin a une histoire hygiénique remplie de vicissitudes. Les vieux médecins le prônaient. Il était encore très en honneur il y a quarante ans. On en médit aujourd'hui. C'est peut-être qu'en moyenne il est plus mauvais qu'autrefois et qu'il y entre moins de raisin. Mais ce qui prouve que ce n'est pas là la seule cause, c'est que beaucoup des médecins qui proscrirent le vin rouge acceptent le vin blanc, qui est encore plus facile à falsifier. Quoi qu'il en soit, il y a contre le vin un courant d'opinion, provoqué par les mauvais vins, mais qu'il serait injuste d'étendre aux bons. Une Commission, instituée en juillet 1893 auprès du Ministère de l'Instruction publique, et dont faisait partie notre collègue le docteur Lancereaux, a été bien inspirée de dire que « l'usage modéré des boissons fermentées produit une légère stimulation du système nerveux. Le cidre détermine une augmentation de la sécrétion urinaire ; la bière à petites doses excite la faim ; le vin agit plus particulièrement comme stimulant ». Mise en présence de la même question, votre Sous-Commission a cru devoir être encore plus prudente ; elle n'a pas voulu parler des avantages de la consommation du vin, de la bière, du cidre, du poiré ; elle a seulement exprimé l'opinion que leur usage modéré est sans inconvénient.

Il est entendu que le terme *modéré* n'est pas défini, parce qu'il n'est pas définissable. Il faudrait faire entrer dans sa définition à la fois celle du vin et celle du consommateur, et cela n'est pas possible. Mais chaque consommateur sait ce que représente pour lui une dose modérée, et tout ce qu'a voulu faire la Sous-Commission est de tranquilliser ce consommateur sur les suites prochaines ou éloignées de son penchant, à la condition qu'il se modère. Elle y est autorisée au nom de la science qui ne nous montre dans le vin et la bière bien préparés aucun principe nocif, au nom de l'expérience qui pendant des siècles a témoigné que l'usage modéré de ces boissons était inoffensif, au nom de l'intérêt agricole des cultures qui aboutissent au vin, à la bière et au cidre, au nom enfin (mais je mets cette considération en dernier lieu) du danger qu'il y a à se montrer intransigeant dans une affaire, même quand on la traite au nom des principes. Il faut accorder quelque chose au consommateur quand on veut obtenir de lui quelque chose.

Ce premier point établi, le terrain était déblayé. L'alcool se présente à la consommation non seulement dans les boissons fermentées, mais aussi dans les eaux-de-vie qu'on en retire, ou bien encore dans les fleg-

mes provenant de la distillation des moûts fermentés de betteraves, de grains et de fruits de diverse nature. Dans ces flegmes et eaux-de-vie, l'alcool est à un degré de concentration qui en change l'effet sur l'organisme. Il est absorbé plus rapidement dans l'estomac, passe en plus grande abondance dans la circulation générale, et l'effet d'excitation qu'il amène lorsqu'il est en petite quantité augmente et peut devenir dangereux lorsque cet effet est porté trop haut chez celui qui s'enivre, ou lorsqu'il se répète trop souvent chez celui qui prend l'habitude de l'alcool. Or toute sensation, même la plus agréable, même la plus utile, lorsqu'elle est trop exaltée, devient un danger. Il en est de même pour l'excitation alcoolique qui, même produite au moyen d'alcool tout à fait pur, est nuisible à la santé, dès qu'elle devient trop violente ou trop fréquente.

Ce n'est pas tout : les flegmes et eaux-de-vie contiennent tous, en proportions variables, des aldéhydes, des alcools supérieurs et d'autres produits provenant soit des fermentations variées dont le moût a été le siège, soit des matières premières qui ont servi à les obtenir. Toutes ces substances, que nous appelons du nom impropre d'*impuretés*, sont toxiques, bien plus toxiques à volume égal que l'alcool. C'est ce que nous ont montré, les premières, les belles expériences de MM. Laborde et Magnan, et ce qui a été confirmé depuis par une foule de physiologistes. Le danger propre de ces substances s'ajoute au danger de l'alcool qui les a entraînées avec lui, de sorte qu'il y a plus d'inconvénients à boire un alcool chargé d'impuretés qu'un alcool au même degré qui n'en contiendrait pas.

C'est de cette conséquence très juste que sont partis tous les projets qui visent à résoudre hygiéniquement le problème de l'alcoolisme en améliorant la rectification. Supprimons ces impuretés, ont-ils dit, et nous obtiendrons un alcool à peu près inoffensif, que le consommateur pourra absorber et l'État vendre en grandes quantités, et qui enrichira le Trésor sans appauvrir la race. Ce serait l'idéal. Mais votre Sous-Commission était obligée de s'en tenir aux réalités.

Elle a d'abord établi comme principe qu'il n'y a aucun alcool distillé qui soit hygiénique, et qu'au delà d'une certaine limite l'alcool éthylique le plus pur devient dangereux. Cette limite est, il est vrai, assez élevée pour lui, plus élevée que pour les autres alcools et les substances qualifiées d'impuretés. Mais il a paru inutile de la fixer, parce que l'alcool tout à fait pur est imbuvable. Le consommateur ne le recherche ou ne l'accepte qu'accompagné de quelques-unes de ces impuretés qui lui donnent son goût, son parfum ou son cachet : de sorte que si en rectifiant l'alcool on le rend plus inoffensif, on lui enlève d'un autre côté sa clientèle.

De bons esprits ont pensé qu'il y avait là une solution, et qu'en ne

donnant aux consommateurs que de l'alcool purifié et par là peu agréable à boire, on les corrigerait de ce goût. C'est évidemment là une illusion. Il faudrait un gouvernement singulièrement fort pour imposer un goût au public, et une police singulièrement vigilante pour empêcher ce public de faire rentrer dans la consommation les impuretés dont on voudrait le priver, ou de les remplacer par d'autres tout aussi dangereuses. L'expérience a du reste montré qu'en Suisse il a fallu rendre aux consommateurs le goût de *fusel*, d'alcool de pomme de terre, auquel ils étaient habitués dans leur alcool. Ils le réclamaient comme électeurs, comme clients, et comme logiciens, car pourquoi leur refuser les éléments de sapidité qu'on concédait aux buveurs de kirsch ou de cognac authentique.

Aucun alcool, même le plus cher, n'est en effet exempt de ces impuretés. Elles varient de l'un à l'autre en qualité et en quantité, sont, de l'un à l'autre, plus ou moins dangereuses à raison de cette double cause de variation; mais elles existent partout, parce qu'elles ne peuvent être absentes nulle part. On ne peut songer à les faire disparaître, et par suite le problème de l'alcoolisme n'est pas un problème de perfectionnement dans la rectification. D'ailleurs ceux-là mêmes qui préconisent cette solution n'ont jamais songé à en faire une solution générale. Ils ne songent nullement à rectifier les kirschs, les cognacs, les rhums et en général les eaux-de-vie de marque. Ils proposent de rectifier seulement les eaux-de-vie de betteraves ou de grains, ce qu'on appelle d'ordinaire les *alcools d'industrie*.

Il est certain qu'il y a un progrès à accomplir de ce côté, et qu'on pourrait chercher à assurer davantage la pureté des alcools provenant non seulement de l'industrie, mais aussi des bouilleurs de cru. Contrairement à ce qu'on croit d'ordinaire, il n'y a aucune supériorité des uns sur les autres. Les fermentations industrielles donnent parfois des alcools très impurs, mais que la rectification purifie. Par contre, les fermentations faites chez les bouilleurs de cru donnent parfois des alcools impurs que la simple distillation à laquelle ils sont soumis n'améliore pas, et quand ces bouilleurs de cru deviennent à leur tour des bouilleurs de cuît et font de l'alcool de betteraves ou de pommes de terre, leur alcool est beaucoup plus mauvais que l'alcool industriel. Un contrôle hygiénique qui arrêterait des l'origine ou empêcherait de circuler un alcool contenant au delà d'un certain minimum d'impuretés serait un bienfait.

Mais autant il est sage d'espérer une amélioration de ce côté, autant il serait vain d'espérer qu'elle sera considérable; car d'un côté, les impuretés, de quelque nature qu'elles soient, ne peuvent être totalement éliminées dès qu'une catégorie de consommateurs les recherche; de l'autre, dès qu'elles atteignent une certaine proportion,



elles deviennent intolérables pour l'immense majorité des consommateurs. C'est entre ces deux barrières naturelles que l'action législative doit se mouvoir, si elle ne veut pas se briser contre plus fort qu'elle.

Or, dans ces limites, il est facile de faire le départ de l'action nocive due aux impuretés et de l'action nocive due à l'alcool qui leur sert d'excipient. On trouve alors qu'il y a disproportion évidente entre ces deux actions nocives. Les substances qui constituent les impuretés sont chacune individuellement un poison plus actif que l'alcool, 80 fois plus actif par exemple pour le furfurol. Mais, amenées à l'état de dilution tolérable pour le consommateur, elles tombent, comme nocivité, au-dessous de l'alcool qui les contient. C'est ainsi par exemple, que pour absorber dans un rhum la quantité de furfurol capable de le tuer par injection dans les veines, un consommateur devrait boire un demi-mètre cube de liquide : il serait mort par l'alcool longtemps avant de l'être par le furfurol consommé.

Votre Sous-Commission a cru nécessaire de traduire cette notion scientifique en disant que « dans les alcools livrés à la consommation, même les plus mal rectifiés, l'action nocive des impuretés est loin d'égaliser l'action nocive de l'alcool qui les contient »,

La question ainsi réglée du côté des impuretés naturelles des alcools de distillation, la Sous-Commission avait devant elle les impuretés artificielles et ajoutées, les bouquets, les essences, les sauces, les ingrédients divers qui servent à préparer les absinthes, bitters, vermouths, apéritifs, et autres boissons d'avant et après les repas. Envisagées dans leur ensemble, ces substances sont beaucoup plus dangereuses, à l'état pur, que les impuretés naturelles. C'est ce qu'ont démontré les expériences de tous les physiologistes. Votre Sous-Commission a été d'accord avec tous ceux qui l'ont précédée dans l'étude de cette question, en affirmant une fois de plus que « le danger est beaucoup plus grand avec les essences, bouquets et autres ingrédients artificiels qu'on ajoute à l'alcool pour en faire les vermouths, apéritifs, absinthes du commerce. L'action nocive de ces substances, même lorsqu'elles sont les plus pures et les mieux choisies, peut augmenter dans une large mesure l'action nocive de l'alcool qui les contient ».

La dernière partie de cette proposition répond à une préoccupation qui existe chez un grand nombre d'hygiénistes, et dont on trouve trace dans tous les projets de réforme du régime des alcools. Presque tous, sinon tous, renoncent à proscrire par exemple l'absinthe : ils considèrent comme impossible cette œuvre hygiénique au premier chef, et comme ils sentent bien qu'ils pratiquent ainsi un énorme accroc dans les principes dont ils s'inspirent, ils se sauvent de cette difficulté en disant qu'on cherchera des substances moins dangereuses



que l'absinthe pour faire de l'absinthe, et qu'au besoin on les demandera à l'Académie de médecine.

Cette Académie, quelle que soit l'illustration de ses membres, sera sûrement fort embarrassée le jour où elle aura à répondre à cette demande. Elle dira sans doute, en se tenant à son tour sur le terrain des principes, qu'elle ne connaît pas plus parmi les essences et bouquets que parmi les alcools supérieurs de substance qui soit agréable au consommateur sans être périlleuse pour lui, point de plaisir qui ne devienne un danger si on en abuse, et qu'en particulier si elle peut enseigner, à la rigueur, à verdir de l'orgeat, elle n'enseignera pas pour cela à en faire de l'absinthe. Il n'y a donc qu'à répéter, à ce sujet, ce que nous disions au sujet des impuretés naturelles des alcools : il est souhaitable qu'un contrôle hygiénique survienne pour empêcher les fabrications trop éhontées de ces boissons à bouquets ou à essences, bien que ce contrôle soit destiné à se heurter à de plus grandes difficultés qu'au sujet de l'alcool ; mais de ce côté-là encore, il n'y a pas grand'chose à espérer au point de vue hygiénique ; car « on ne connaît aucune substance qui soit agréable au goût, capable de donner à l'alcool pur une des saveurs réclamées par le consommateur, et qui ne soit pas en même temps une substance dangereuse pour qui la consomme habituellement. »

Ceci est la 6<sup>e</sup> proposition votée par la Sous-Commission, et elle termine l'exposé des principes. La 7<sup>e</sup> proposition tire de ces principes leurs premières conséquences pratiques, et on va y retrouver, condensées et résumées, quelques-unes des conclusions rencontrées plus haut.

« En ce qui concerne les alcools de distillation, il est souhaitable de les voir ramenés à un taux de pureté qui les rende le plus inoffensifs possible ; mais on ne peut espérer trouver la solution du problème de l'alcoolisme dans l'amélioration de ces produits.

« En ce qui concerne les liqueurs alcooliques fabriquées avec des bouquets ou des essences, elles présentent un tel danger pour la santé publique qu'il faut chercher autant que possible à en restreindre l'usage ; on doit essayer aussi de rendre plus inoffensifs les ingrédients qui servent à les fabriquer, mais on n'en connaît pas qui satisfassent à la fois le consommateur, et soient sans action nocive sur ses organes. »

Dans toutes les directions, c'est donc toujours la même loi qu'on rencontre : le plaisir engendre l'abus, et l'abus fait naître le danger. Il y a au fond de ce problème de l'alcoolisme, une question de physiologie qui domine la question de législation. Contre ce fonctionnement physiologique, ni l'individu ni la société ne sont désarmés, mais à la condition d'avoir appris à le bien connaître. L'individu peut se surveiller et faire intervenir sa contrainte morale ; la société peut, par l'éduca-

tion, rendre chez lui l'exercice de la volonté plus facile et plus libre, diminuer autour de lui les occasions de tentation en diminuant le nombre des cabarets, etc. Mais discuter ces moyens serait empiéter sur le domaine de la Sous-Commission des voies et moyens. Pour le moment, la Sous-Commission d'hygiène ne peut que lui renvoyer, à titre documentaire, le résultat de ses délibérations, qu'elle a terminées par la proposition suivante qui les résume :

« Toute réforme qui veut être hygiénique doit donc s'attacher, d'abord et surtout, à diminuer la quantité d'alcool consommé, et en second lieu à en améliorer la qualité. »

Si on revient maintenant sur l'ensemble de ces propositions, qui sont surtout d'ordre théorique, et si on les confronte avec les divers projets de monopole présentés jusqu'à ce jour, on peut voir que la conclusion de cette comparaison est la suivante :

La Sous-Commission conclut qu'il y a quelque chose à gagner au point de vue de l'hygiène à assurer la purification des alcools d'alambic. Divers projets de monopole visent le même but, mais latéralement, et on peut l'atteindre sans aucun monopole.

La Sous-Commission conclut plus fortement encore contre les boissons à bouquets et à essences. Les divers projets de monopole acceptent l'absinthe, et émettent seulement l'espérance illusoire qu'on arrivera à en fabriquer d'hygiénique; à ce point de vue, votre Sous-Commission ne peut se rallier à aucun d'eux.

La Sous-Commission conclut enfin qu'il faut essayer de restreindre le plus possible le nombre des buveurs. Tout monopole rêve au contraire de l'augmenter, et cela par la force des choses, et malgré toute législation. A ce point de vue, votre Sous-Commission considérerait tout monopole comme funeste au point de vue de l'hygiène, car il n'existe pas d'alcool hygiénique, si bien purifié ou si bien cuisiné qu'il soit.

### CONCLUSIONS.

1. — L'alcool, lorsqu'il est consommé à l'état de vin, de bière, de cidre, de poiré, etc., est une substance dont l'usage modéré est sans inconvénients lorsque ces boissons sont bien préparées.

2. — Aucun alcool distillé n'est hygiénique, et, au delà d'une certaine limite, l'alcool le plus pur devient dangereux.

3. — Les impuretés naturelles qui accompagnent la distillation l'alcool de fermentation ajoutent leur danger propre au danger de l'alcool qui les contient.

4. — Dans les alcools livrés à la consommation, même les plus mal rectifiés, l'action nocive des impuretés est loin d'égaliser l'action nocive de l'alcool qui les contient.



5. — Le danger est beaucoup plus grand avec les essences, bouquets et autres ingrédients artificiels qu'on ajoute à l'alcool pour en faire les vermouths, apéritifs, absinthes du commerce, etc. L'action nocive de ces substances, même lorsqu'elles sont les plus pures et les mieux choisies, peut augmenter dans une large mesure l'action nocive de l'alcool qui les contient.

6. — On ne connaît aucune substance qui soit agréable au goût, capable de donner à l'alcool pur une des saveurs réclamées par le consommateur, et qui ne soit pas en même temps une substance dangereuse pour qui la consomme habituellement.

7. — En ce qui concerne les alcools de distillation, il est souhaitable de les voir ramenés à un taux de pureté qui les rende le plus inoffensifs possible; mais on ne peut espérer trouver la solution du problème de l'alcoolisme dans l'amélioration de ces produits.

En ce qui concerne les liqueurs alcooliques fabriquées avec des bouquets ou des essences, elles présentent un tel danger pour la santé publique qu'il faut chercher autant que possible à en restreindre l'usage; on doit essayer aussi de rendre plus inoffensifs les ingrédients qui servent à les fabriquer; mais on n'en connaît pas qui satisfassent à la fois le consommateur et soient sans action nocive sur ses organes.

8. — Toute réforme qui veut être hygiénique doit s'attacher d'abord et surtout à diminuer la quantité d'alcool consommé, et en second lieu à en améliorer la qualité.

---

*Le Gérant : G. MASSON.*

---

Sceaux. — Imprimerie E. Charaire.